

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CYTOTOXICITÉ ET VOIES D'ENTRÉE CELLULAIRE  
DU CADMIUM DANS LES OSTÉOBLASTES HUMAINS

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

MARTINE LÉVESQUE

MAI 2007

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Robert Moreau, et ma co-directrice, Catherine Jumarie pour m'avoir fait confiance depuis le début et avoir commenté minutieusement toutes les étapes de la rédaction de ce mémoire. Il est évident que je n'aurais pu compléter une maîtrise et un mémoire comme celui-ci sans leur apport constant d'informations et de bons conseils et leur intérêt évident pour mon (notre) projet.

Je remercie Robert pour avoir accepté sans hésiter ma candidature lors de ma requête en 2004. Il s'est immédiatement montré intéressé à me faire une place dans son jeune laboratoire afin que je puisse participer à l'établissement des premières assises entre les projets de Catherine et les siens. Son optimisme contagieux face au travail à accomplir et la vision à long terme qu'il pose sur ses travaux de recherches m'ont permis de croire à l'importance et la place d'un projet comme celui-ci.

Je remercie Catherine pour ses réponses toujours très exactes, pertinentes et élaborées à mes nombreuses interrogations de nature scientifique. Son expérience et son esprit critique ont grandement contribué à la structure de mon travail. De plus, son intégrité et sa présence chaleureuse m'ont permis de garder le sourire dans les moments difficiles.

Je désire également remercier les collègues des deux laboratoires, Corine, Dominique, Élie, Élyse, Marc, Mathieu, Patrick, Pierre-Michel et Sarah, pour toutes les discussions, le partage d'idées et les bons moments passés ensemble.

D'une manière plus personnelle, ma famille (Haeck et Lévesque) et mes amis ont énormément apporté à l'accomplissement et à la réussite de ce projet (et de l'ensemble de mes études universitaires). Sans leur présence, leurs encouragements, leur appui et leurs précieux conseils, il m'aurait été impossible d'écrire ces lignes.

Un merci spécial à Yannick, mon amoureux, qui s'est montré tout naturellement patient, généreux, compréhensif et m'a appuyé sans relâche.

Finalement, un grand merci à ma petite Stella qui a grandi bien sagement dans mon ventre au moment d'écrire ce mémoire. D'abord poussière d'étoile et maintenant du haut de ses quatre mois, elle me rappelle constamment que les plus grandes choses, celles qu'on ne peut expliquer, sont aussi les plus simples.



## TABLE DES MATIÈRES

<u>LISTE DES FIGURES</u> .....	ix
<u>LISTE DES TABLEAUX ET DES EQUATIONS</u> .....	xii
<u>LISTE DES ABREVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES</u> .....	xiv
<u>RESUME</u> .....	xix
<u>CHAPITRE 1</u> .....	1
1.1- SYSTEME OSSEUX .....	1
1.1.1- <i>Système osseux</i> .....	1
1.1.2- <i>L'os</i> .....	1
1.1.3- <i>Ostéoclastes et résorption osseuse</i> .....	2
1.1.4- <i>Ostéoblastes et formation osseuse</i> .....	2
1.1.5- <i>Cycle de remodelage osseux</i> .....	3
1.1.6- <i>Régulation du remodelage osseux</i> .....	4
1.2- CADMIUM .....	7
1.2.1- <i>Propriétés chimiques et physiques</i> .....	7
1.2.2- <i>Biodisponibilité et spéciation</i> .....	8
1.2.3- <i>Sources naturelles d'émission</i> .....	10
1.2.4- <i>Sources anthropiques d'émission</i> .....	10
1.2.5- <i>Voies d'exposition et mécanismes de toxicité</i> .....	10
1.2.6- <i>Cadmium et toxicité pulmonaire</i> .....	11

1.2.7- <i>Cadmium et toxicité rénale</i> .....	12
1.2.8- <i>Effets indirects du cadmium sur le métabolisme osseux</i> .....	12
1.2.9- <i>Effets directs du cadmium sur le métabolisme osseux</i> .....	15
1.3- VOIES D'ENTREE DU CADMIUM .....	15
1.3.1- <i>Transport du cadmium dans les cellules</i> .....	15
1.3.2- <i>Implication des systèmes de transport du calcium, du fer et du zinc dans le transport de Cd</i> .....	16
1.3.3- <i>Canaux calciques voltage-dépendants</i> .....	17
1.3.4- <i>Canaux TRP</i> .....	19
1.3.5- <i>Transporteur NRAMP2</i> .....	21
1.3.6- <i>Concentration létale moyenne dans différents types cellulaires</i> ..	22
1.4- MECANISMES DE PROTECTION CELLULAIRE CONTRE LA TOXICITE DU CADMIUM .....	23
1.4.1- <i>Aperçu général des mécanismes de protection</i> .....	23
1.4.2- <i>Métallothionéines</i> .....	23
1.4.3- <i>HSP70</i> .....	25
1.4.4- <i>Glutathion</i> .....	26
1.4.5- <i>Autres mécanismes de protection</i> .....	27
1.5- MODELES CELLULAIRES UTILISES .....	28
<u>CHAPITRE 2</u> .....	30
2.1- HYPOTHESES ET OBJECTIFS.....	30

<u>CHAPITRE 3</u> .....	32
3.1- MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	32
3.1.1- Culture cellulaire .....	32
3.1.2- Méthode de mesure de cytotoxicité du cadmium.....	32
3.1.3- Mesure de cytotoxicité du cadmium en présence de bloqueurs et d'ouvriers de canaux calciques .....	33
3.1.4- Transport de cadmium dans les ostéoblastes .....	34
3.1.5- Utilisation de bloqueurs et d'ouvriers de canaux afin de déterminer les voies d'entrée du cadmium .....	36
3.1.6- Étude de l'expression des métallothionéines dans les différentes lignées .....	36
3.1.7- Étude de l'expression de HSP70 dans les différentes lignées .....	38
3.1.8- Analyse des résultats .....	38
3.1.8.1- Accumulation à temps fixe, en condition de vitesse initiale.....	38
3.1.8.2- Accumulation en fonction du temps .....	40
3.1.8.3- Analyse de la cytotoxicité du cadmium .....	40
3.1.9- Transport du cadmium en fonction du niveau de confluence .....	41
<u>CHAPITRE 4</u> .....	43
4.1- RÉSULTATS .....	43
4.1.1- Cytotoxicité du cadmium pour la lignée MG-63.....	43
4.1.1.1- Viabilité cellulaire en fonction de l'augmentation de la concentration de cadmium.....	43
4.1.2- Transport de cadmium dans la lignée MG-63 .....	44

4.1.2.1- Accumulation cellulaire de $^{109}\text{Cd}$ en fonction du temps .....	44
4.1.2.2- Analyse de la cinétique de l'accumulation cellulaire de $^{109}\text{Cd}$ .....	45
4.1.2.3- Accumulation cellulaire de $^{109}\text{Cd}$ en fonction de la spéciation inorganique .....	49
4.1.2.4- Composantes spécifique et non-spécifique selon le milieu de transport .....	50
4.1.2.5- Accumulation cellulaire de $^{109}\text{Cd}$ et interaction avec le calcium .....	51
4.1.2.6- Accumulation cellulaire de $^{109}\text{Cd}$ et canaux calciques voltage-dépendants .....	53
4.1.2.7- Accumulation cellulaire de $^{109}\text{Cd}$ et canaux calciques de type TRPC .....	57
4.1.3- Cytotoxicité du cadmium en présence de bloqueurs et d'ouvreurs de canaux calciques pour la lignée MG-63 .....	58
4.1.3.1- Viabilité cellulaire en présence de nifédipine .....	59
4.1.3.2- Viabilité cellulaire en présence de vérapamil .....	61
4.1.3.3- Viabilité cellulaire en présence de Bay-K8644 .....	63
4.1.3.4- Viabilité cellulaire en présence de SKF96365 .....	65
4.1.3.5- Viabilité cellulaire en présence de 2APB .....	67
4.1.3.6- Viabilité cellulaire en présence de capsazépine .....	69
4.1.3.7- Viabilité cellulaire en présence de icilin .....	71
4.1.4- Comparaison entre la lignée MG-63 et deux autres modèles ostéoblastiques, SaOS-2 et U2OS .....	73
4.1.4.1- Viabilité cellulaire en fonction de l'augmentation de la concentration de cadmium dans les trois lignées .....	73
4.1.4.2- Accumulation cellulaire de $^{109}\text{Cd}$ en fonction du	

<i>temps dans les trois lignées .....</i>	75
4.1.4.3- <i>Effet du cadmium sur l'expression d'ARN messenger</i> <i>de métallothionéines et de HSP70 dans les trois</i> <i>lignées .....</i>	76
 <u>CHAPITRE 5 .....</u>	80
5.1- DISCUSSION .....	80
5.1.1- <i>Cytotoxicité du cadmium et mécanismes de résistance.....</i>	80
5.1.2- <i>Transport de cadmium et spéciation inorganique .....</i>	82
5.1.3- <i>Mimétisme ionique et systèmes de transport membranaire .....</i>	85
5.2- CONCLUSION.....	90
 <u>CRITIQUE DU PROJET .....</u>	92
 <u>BIBLIOGRAPHIE .....</u>	95

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
1.1	Cycle de remodelage osseux.	4
1.2	Rôle des ostéoblastes et des ostéoclastes dans la régulation du remodelage osseux.	5
1.3	Effets indirects du Cd sur les os résultant d'un dysfonctionnement tubulaire rénal.	14
1.4	Ostéoporose : Amincissement et fragilisation de l'os.	14
1.5	Structure de la métallothionéine.	24
3.1	Accumulation de 0,5 $\mu\text{M}$ $^{109}\text{Cd}$ en tampon chlorure pour la lignée MG-63.	41
4.1	Viabilité cellulaire mesurée à l'aide de l'essai MTT pour la lignée MG-63.	43
4.2	Accumulation cellulaire de $^{109}\text{Cd}$ en fonction du temps dans la lignée MG-63.	45
4.3	Accumulation initiale (3 minutes) de 0,5 $\mu\text{M}$ $^{109}\text{Cd}$ en absence et en présence de 100 $\mu\text{M}$ de Cd non radioactif dans la lignée MG-63.	46
4.4	Accumulation initiale (3 minutes) de 0,5 $\mu\text{M}$ $^{109}\text{Cd}$ en présence de concentration de Cd non radioactif variant de 0 à 100 $\mu\text{M}$ dans la lignée MG-63.	48
4.5	Accumulation initiale (3 minutes) de 0,5 $\mu\text{M}$ $^{109}\text{Cd}$ en milieu chlorure et nitrate dans la lignée MG-63.	49
4.6	Accumulation initiale (3 minutes) de 0,5 $\mu\text{M}$ $^{109}\text{Cd}$ en milieu chlorure et nitrate en absence ou en présence de 2,5 mM Ca dans la lignée MG-63.	51
4.7	Accumulation initiale (3 minutes) de 0,5 $\mu\text{M}$ $^{109}\text{Cd}$ en milieu chlorure et nitrate en absence ou en présence de 100 $\mu\text{M}$ de Cd non radioactif dans la lignée MG-63.	52
4.8	Accumulation initiale (3 minutes) de 0,5 $\mu\text{M}$ $^{109}\text{Cd}$ en milieu chlorure et nitrate en absence de Ca et en concentration de $\text{K}^+$ standard ou élevée dans la lignée MG-63.	54
4.9	Accumulation initiale (3 minutes) de 0,5 $\mu\text{M}$ $^{109}\text{Cd}$ en milieu nitrate en absence de Ca, en concentration de $\text{K}^+$ élevée et en présence ou en absence de nifédipine ou de vérapamil dans la lignée MG-63.	56

Figure	Titre	Page
4.10	Accumulation initiale (3 minutes) de 0,5 $\mu\text{M}$ $^{109}\text{Cd}$ en milieu chlorure et nitrate sans Ca en présence ou en absence de thapsigargine ou de SKF96365 dans la lignée MG-63.	57
4.11	Viabilité cellulaire en présence de nifédipine (entre 0 et 100 $\mu\text{M}$ ) et de concentrations de Cd variant entre 0,25 et 50 $\mu\text{M}$ (a) et activité MTT en présence de nifédipine (entre 0 et 100 $\mu\text{M}$ ) seule (b) mesurée dans la lignée MG-63.	60
4.12	Viabilité cellulaire en présence de vérapamil (entre 0 et 100 $\mu\text{M}$ ) et de concentrations de Cd variant entre 0,25 et 50 $\mu\text{M}$ (a) et activité MTT en présence de vérapamil (entre 0 et 100 $\mu\text{M}$ ) seul (b) mesurée dans la lignée MG-63.	62
4.13	Viabilité cellulaire en présence de Bay-K8644 (entre 0 et 100 $\mu\text{M}$ ) et de concentrations de Cd variant entre 0,25 et 75 $\mu\text{M}$ (a) et activité MTT en présence de Bay-K8644 (entre 0 et 100 $\mu\text{M}$ ) seul Cd (b) mesurée dans la lignée MG-63.	64
4.14	Viabilité cellulaire en présence de SKF96365 (entre 0 et 100 $\mu\text{M}$ ) et de concentrations de Cd variant entre 0,25 et 50 $\mu\text{M}$ (a) et activité MTT en présence de SKF96365 (entre 0 et 10 $\mu\text{M}$ ) seul (b) mesurée dans la lignée MG-63.	66
4.15	Viabilité cellulaire en présence de 2APB (entre 0 et 100 $\mu\text{M}$ ) et de concentrations de Cd variant entre 0,25 et 50 $\mu\text{M}$ (a) et activité MTT en présence de 2APB (entre 0 et 100 $\mu\text{M}$ ) seul (b) mesurée dans la lignée MG-63.	68
4.16	Viabilité cellulaire en présence de capsazépine (entre 0 et 100 $\mu\text{M}$ ) et de concentrations de Cd variant entre 0,25 et 50 $\mu\text{M}$ (a) et activité MTT en présence de capsazépine (entre 0 et 100 $\mu\text{M}$ ) seule (b) mesurée dans la lignée MG-63.	70
4.17	Viabilité cellulaire en présence de icilin (entre 0 et 100 $\mu\text{M}$ ) et de concentrations de Cd variant entre 0,25 et 50 $\mu\text{M}$ (a) et activité MTT en présence de icilin (entre 0 et 100 $\mu\text{M}$ ) seul (b) mesurée dans la lignée MG-63.	72
4.18	Viabilité cellulaire et comparaison des $\text{CL}_{50}$ à l'aide de l'essai MTT dans les lignées MG-63, SaOS-2 et U2OS.	74
4.19	Accumulation cellulaire de $^{109}\text{Cd}$ en fonction du temps dans les cellules MG-63, SaOS-2 et U2OS.	76
4.20	Amplification par RT-PCR des ARN messagers de métallothionéines et de HSP70 dans la lignée MG-63.	77
4.21	Amplification par RT-PCR des ARN messager de métallothionéines et de HSP70 dans la lignée SaOS-2.	78

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
4.22	Amplification par RT-PCR des ARN messager de métallothionéines et de HSP70 dans la lignée U2OS.	78



## LISTE DES TABLEAUX ET DES ÉQUATIONS

Tableau	Titre	Page
1.1	Constante de complexation du Cd avec divers ligands inorganiques et spéciation du Cd en milieu chlorure et nitrate à pH 7,4.	9
4.1	Paramètres cinétiques de l'accumulation initiale (3 minutes) de $^{109}\text{Cd}$	48
4.2	Accumulation cellulaire (3 min) totale et spécifique de $0.5\ \mu\text{M}$ de $^{109}\text{Cd}$ en milieu chlorure et nitrate en absence de Ca et en concentration de $\text{K}^+$ standard (contrôle) ou élevée.	55
4.3	Accumulation cellulaire (3 min) totale et spécifique de $0,5\ \mu\text{M}$ de $^{109}\text{Cd}$ en milieu nitrate en absence de Ca avec ou sans (contrôle) nifédipine ou vérapamil.	56
4.4	Accumulation cellulaire (3 min) totale et spécifique de $0.5\ \mu\text{M}$ de $^{109}\text{Cd}$ en milieu chlorure et nitrate sans Ca en présence ou non de thapsigargine ou de SKF96365.	58
4.5	Paramètres de toxicité du Cd en présence de nifédipine à des concentrations variant entre 0 et $100\ \mu\text{M}$ .	61
4.6	Paramètres de toxicité du Cd en présence de vérapamil à des concentrations variant entre 0 et $100\ \mu\text{M}$ .	63
4.7	Paramètres de toxicité du Cd en présence de Bay-K8644 à des concentrations variant entre 0 et $100\ \mu\text{M}$ .	65
4.8	Paramètres de toxicité du Cd en présence de SKF96365 à des concentrations variant entre 0 et $10\ \mu\text{M}$ .	67
4.9	Paramètres de toxicité du Cd en présence de 2APB à des concentrations variant entre 0 et $100\ \mu\text{M}$ .	69
4.10	Paramètres de toxicité du Cd en présence de capsazépine à des concentrations variant entre 0 et $100\ \mu\text{M}$ .	71
4.11	Paramètres de toxicité du Cd en présence de icilin à des concentrations variant entre 0 et $100\ \mu\text{M}$ .	73
4.12	Paramètres de toxicité du Cd dans les lignées MG-63, SaOS-2 et U2OS.	75

Équation		Page
3.1	Michaelis-Menten	
	$v_i = \frac{V_{\max} [^{109}\text{Cd}]}{K_m + [^{109}\text{Cd}]} + k_D [^{109}\text{Cd}]$	39
3.2	Michaelis-Menten modifiée tenant compte d'une inhibition compétitive du transport de $^{109}\text{Cd}$ par le Cd	
	$v_i = \frac{V_{\max} [^{109}\text{Cd}]}{K_m + [I] + [^{109}\text{Cd}]} + k_D [^{109}\text{Cd}]$	39
3.3	Monoexponentielle croissante	
	$A = A_0 + A_{\max} (1 - e^{-kt})$	40
3.4	Courbe dose-effet d'inhibition croissante	
	$Y = Y_{\min} + \frac{Y_{\max} - Y_{\min}}{1 + 10^{((\log CL_{50} - x) \cdot Hill)}}$	40

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

### Organismes

IARC	International Agency for Research on Cancer
ICETT	International Center for Environmental Technology Transfer
OMS	Organisation mondiale de la santé

### Symboles chimiques

Ca	Calcium	O	Oxygène
Cd	Cadmium	Zn	Zinc
Cr	Chrome		
Cu	Cuivre	-Cl	Chlorure
Fe	Fer	-CO <sub>3</sub>	Carbonate
H	Hydrogène	F-	Fluorure
Hg	Mercure	OH	Hydroxyde
Mg	Magnésium	PO <sub>4</sub>	phosphate
Na	Sodium	-S	Sulfure
Ni	Nickel	-SO <sub>4</sub>	Sulfate

### Produits chimiques

DEPC	Diethyl pyrocarbonate
------	-----------------------

DMEM/F12	<i>Dulbecco's modified Eagle essential minimum medium/ Nutrient Mixture F-12 Ham</i>
EDTA	Sel disodique de l'acide éthylènediamine tétraacétique
EtBr	Bromure d'éthidium
FBS	<i>Fetal Bovine serum</i> (Sérum foetal bovin)
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
MTT	Tetrazolium 3,[4,5-dimethylthiazol2-yl]-2,5-diphennyltetrazolium bromide
TP	Thapsigargine
2-APB	2-aminoethoxydiphenyl borate

### **Protéines**

BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
DKK	<i>Protéine Dickkopf</i>
DCT1	<i>Divalent-cation transporter I</i>
DMT1	<i>Divalent-metal transporter I</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
GSH	Glutathion sous forme réduite
GSSG	Glutathion sous forme oxydée
HC	Alpha-1-microglobuline
HSE	<i>Heat-shock element</i>
HSF-1	<i>Heat-shock factor 1</i>
HSP70	<i>Heat-shock proteins; 70 kDa</i>

IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
MT	Métallothionéine
Nramp2	<i>Natural resistance-associated macrophage protein 2</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
pRb	<i>Protéine rétinoblastome</i>
ROC	<i>Receptor-operated <math>Ca^{2+}</math> entry</i>
SOC	<i>Stored-operated <math>Ca^{2+}</math> entry</i>
TGF $\beta$	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TRP	<i>Transient receptor potential</i>
TRPA	<i>Transient receptor potential ankyrin</i>
TRPC	<i>Transient receptor potential canonical</i>
TRPM	<i>Transient receptor potential melastatin</i>
TRPML	<i>Transient receptor potential muculipin</i>
TRPN	<i>Transient receptor potential no mechanoreceptor potential C</i>
TRPP	<i>Transient receptor potential polycystin</i>
TRPV	<i>Transient receptor potential vanilloid</i>
VDCC	<i>Voltage-dependent calcium channel</i> (Canaux calciques voltage-dépendants)
VOCC	<i>Voltage-operated calcium channel</i>
VSCC	<i>Voltage-sensitive calcium channel</i>
ZnT1	<i>Zinc transporter 1</i>

### Autres abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Cristaux d'hydroxyapatite
CCE	<i>Capacitative calcium entry</i> (Entrée de Ca capacitative)
$\text{CdCl}_n^{2-n}$	Chlorocomplexes de cadmium
Cd-Alb	Complexe cadmium – albumine
Cd-MT	Complexe cadmium – métallothionéine
CL <sub>50</sub>	Concentration létale pour 50% des cellules exposées
DAG	Diacylglycérol
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
GAG	Glycosaminoglycan
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase
GH	<i>Growth hormone</i> (hormone de croissance)
HIEC	<i>Human intestinal epithelial cell</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-triphosphate
Itaï-itaï byo	Maladie «aie-aie»
K <sub>c</sub>	Constante de formation de complexes

LDH	<i>Lactate dehydrogenase</i>
MRE	<i>Metal regulatory element</i> (élément de réponse aux métaux)
MTF-1	<i>Metal-responsive transcription factor-1</i> (facteur-1 de transcription en réponse aux métaux)
OPG	Ostéoprotégérine
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (amplification en chaîne par polymérase)
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandine E <sub>2</sub>
pH	Potentiel d'hydrogène
PLC	Phospholipase C
PTH	Hormone parathyroïdienne
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor-κB</i>
RANK-L	<i>Receptor activator of nuclear factor-κB ligand</i>
RE	Réticulum endoplasmique
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RT	<i>Reverse transcriptase</i> (transcriptase inverse)
TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
1,25-DHCC ou 1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1,25 dihydroxycholécalférol (Forme active de la vitamine D)



## RÉSUMÉ

L'exposition au cadmium (Cd) représente un facteur de risque pour la perte osseuse et le développement de l'ostéoporose. Jusqu'à récemment, les études portaient principalement sur les effets toxiques indirects du Cd sur l'os via un dysfonctionnement rénal et une perturbation du métabolisme du calcium (Ca). Des données récentes révèlent toutefois qu'une faible exposition chronique au Cd sans effet néphrotoxique entraîne des dommages directs aux os. Le premier objectif de cette étude visait à évaluer dans quelle mesure le Cd est accumulé dans les ostéoblastes et à déterminer sa cytotoxicité. Pour ce faire, nous avons mesuré l'accumulation cellulaire de  $^{109}\text{Cd}$  ainsi que la viabilité cellulaire par l'essai MTT. De plus afin de tenter d'identifier les voies d'entrée cellulaire du Cd, nous avons utilisé certains bloqueurs (nifédipine, vérapamil, 2-APB, SKF26365 et capsazépine) et activateurs (Bay-K8644, icilin et thapsigargine) de canaux. Le second objectif était de mieux comprendre comment la cellule ostéoblastique se protège contre les effets toxiques du Cd. Pour y répondre, nous avons étudié l'expression de certains gènes reconnus pour être impliqués dans la protection cellulaire par une technique de RT-PCR. Après avoir exposé les cellules MG-63 au Cd pendant 24h, nous avons obtenu une valeur de  $\text{CL}_{50}$  de  $15,5 \pm 1,1 \mu\text{M}$ . Nos résultats ont également montré la présence de transport spécifique permettant l'entrée de Cd dans les ostéoblastes MG-63. La spéciation du Cd est déterminante pour son entrée. Nous avons observé une accumulation cellulaire sous forme de  $\text{Cd}^{2+}$  et possiblement sous forme de  $\text{CdCl}_n^{2-n}$ . L'observation d'une inhibition de l'entrée de Cd par le Ca nous a mené à étudier les canaux calciques comme voies d'entrée du Cd. Afin de déterminer si les canaux calciques voltage-dépendants (VDCC) constituent une voie d'entrée du Cd dans les ostéoblastes humains, les cellules MG-63 ont été exposées à  $0,5 \mu\text{M}$   $^{109}\text{Cd}$  durant 3 minutes dans différents milieux inorganiques. Le milieu nitrate (dans lequel 80% du Cd total dissous est présent sous forme de  $\text{Cd}^{2+}$ ) favorise l'entrée de Cd par rapport au milieu chlorure (dans lequel 14% du Cd total dissous est présent sous forme de  $\text{Cd}^{2+}$ ), suggérant que le Cd peut pénétrer la cellule sous forme  $\text{Cd}^{2+}$ . Lorsque la concentration en potassium (K) du milieu d'exposition est augmentée afin d'activer les VDCC, aucune augmentation de l'entrée de Cd n'est observée. L'utilisation de nifédipine et de vérapamil, deux bloqueurs de VDCC, n'a aucun effet sur l'entrée du Cd. Nos résultats n'indiquent donc aucune implication des VDCC dans l'entrée de Cd dans les ostéoblastes MG-63. Les résultats de transport membranaires concordent avec les essais MTT qui montrent l'absence d'effet de la nifédipine, du vérapamil et du Bay-K8644 sur la cytotoxicité du Cd. Les canaux TRPC ne semblent pas non plus être impliqués dans l'entrée de Cd tel que démontré par l'absence d'effet de la thapsigargine sur le transport de Cd utilisée seule ou combinée au SKF96365. Aussi, le SKF96365 ne semble pas modifier les résultats de MTT. L'effet protecteur du 2APB et de la capsazépine observé lors d'essais MTT suggère la participation



respective des canaux TRPM7 et TRPM8 dans l'entrée de Cd. De plus, nous avons observé une différence dans la cytotoxicité du Cd ( $CL_{50}$  variant jusqu'à 3 fois) dans les lignées ostéoblastiques humaines MG-63, SaOS-2 et U2OS (respectivement  $16 \pm 2$ ,  $30 \pm 6$  et  $55 \pm 4 \mu M$ ). Nos résultats n'indiquent aucune différence dans les niveaux d'accumulation de Cd entre les trois lignées. Nous proposons donc l'hypothèse voulant qu'il existe des différences au niveau des mécanismes de gestion du Cd intracellulaire. Nos résultats préliminaires obtenus par RT-PCR montrent que chacune des lignées expriment les ARNm de MTs et de HSP70. Il est donc possible que l'induction de MTs et de HSP70 diffère entre les lignées cellulaires. En conclusion, le Cd entre dans les ostéoblastes MG-63 de façon spécifique en empruntant une ou des voies calciques, dont possiblement les canaux TRPM7 et TRPM8. Il est possible que la cytotoxicité qui s'en suit contribue aux déséquilibres oméostatiques observés aux niveaux des os.

**Mots clés :** cadmium, calcium, spéciation, ostéoblastes, os, cellules MG-63, cellules SaOS-2, cellules U2OS

## CHAPITRE 1

### 1.1- SYSTÈME OSSEUX

#### 1.1.1- Système osseux

Le système osseux comprend l'ensemble des os et de leurs cartilages. Il assure trois grands rôles. Premièrement, sa fonction mécanique est liée à son rôle de support des tissus mous et de point d'attache pour les muscles. Il joue également un rôle important dans la protection des organes internes vitaux et de la moelle osseuse. Finalement, il constitue une réserve métabolique d'ions, notamment le phosphore et le calcium, afin de maintenir l'homéostasie minérale (Baron, 1993).

#### 1.1.2- L'os

L'os est un tissu vivant complexe et dynamique. Le tissu osseux, comme tous les autres tissus conjonctifs, est composé de cellules disséminées entourées par une matrice riche en matière intercellulaire. La matrice organique représente environ 22% de la matrice osseuse et forme l'ostéoïde ou substance préosseuse (Toppets *et al.*, 2004). La matière intercellulaire est composée majoritairement de protéines fibreuses structurales, soit le collagène de type I, aussi appelé collagène fibrillaire. Elle comprend également l'élastine, les protéines fibreuses adhérentes (fibronectine) et la substance interfibrillaire. La substance interfibrillaire est composée de glycosaminoglycans (GAG), de protéoglycans, de petites protéines telles que l'ostéopontine, l'ostéonectine, l'ostéocalcine et les sialoprotéines osseuses, et de lipides en petite quantité (Toppets *et al.*, 2004). L'eau occupe 9% de l'os adulte et la proportion restante, soit 69%, correspond à la matière inorganique (Toppets *et al.*, 2004). Les cristaux d'hydroxyapatite  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$  représentent majoritairement la matière inorganique. Ils sont alignés sur ou dans les fibres de collagène (Baron, 1993) ce qui confère de la dureté au tissu osseux. On trouve également du carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ), de l'hydroxyde de magnésium ( $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ), du fluorure ( $\text{F}^-$ ) et du sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) (Tortora et Grabowski, 2001).

Toute cette matrice osseuse est métaboliquement active et est renouvelée en permanence grâce à l'équilibre entre la résorption et la formation osseuse. Ce sont les ostéoclastes et les ostéoblastes qui permettent respectivement l'élimination des tissus osseux vieillissants et la formation osseuse.

#### *1.1.3- Ostéoclastes et résorption osseuse*

Les ostéoclastes (*klastos* = brisé) sont responsables de la dégradation de la matrice, un processus normal de maintien et de réparation du tissu osseux. Ce sont des cellules géantes issues de la fusion d'environ quatre à cinquante monocytes. Elles sont concentrées dans l'endoste (*endon* = en dedans) où elles digèrent la surface osseuse calcifiée sous-jacente. C'est la bordure ondulée des ostéoclastes, formée de plis profonds de la membrane plasmique, qui permet l'adhésion et la fermeture hermétique sur la surface osseuse à résorber. Cette adhésion se fait *via* des récepteurs de type intégrine se liant à des séquences spécifiques de la matrice protéique (Baron, 1993). Les cristaux de minéraux sont mobilisés par la digestion de leurs liens au collagène et aux autres protéines, et sont dissous par un environnement acide formé par la sécrétion de protons. Les fibres de collagène restantes sont digérées soit par l'activation de collagénase latente ou par l'action de cathepsines sécrétées par les ostéoclastes et actives à pH faible (Baron, 1993).

#### *1.1.4- Ostéoblastes et formation osseuse*

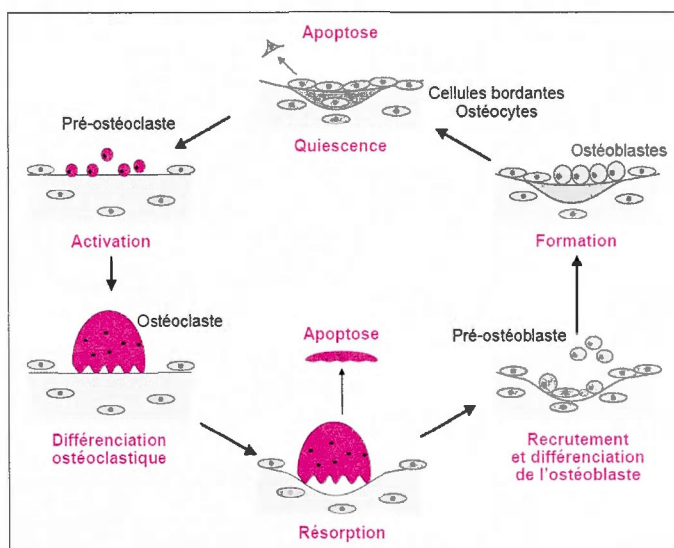
Les ostéoblastes (*blastos* = germe) sont issus de cellules ostéogéniques (*genos* = origine) dérivées des cellules mésenchymateuses primitives. Ce sont les cellules responsables de la production de la matrice osseuse. Ils n'apparaissent et ne fonctionnent jamais seuls; ils peuvent être environ 100 à 400 par site de formation de l'os. Les ostéoblastes synthétisent en continu une matrice osseuse non calcifiée (Baron, 1993). Ils synthétisent et sécrètent des fibres de collagène ainsi que d'autres constituants organiques nécessaires au développement et au maintien de l'os. Ces cellules sont également essentielles à l'amorçage de la calcification.

Les gènes exprimés par les cellules de la lignée ostéoblastique diffèrent tout au cours de l'ostéogenèse *in vitro* (Aubin et Liu, 1996; Marie, 1999). Lors de la phase de prolifération, des gènes précoces, tels que c-fos et histone H4, sont exprimés. Ensuite, lors de la maturation ostéoblastique, les gènes liés à la production de matrice tels que la phosphatase alcaline, le collagène de type I, l'ostéopontine, le «transforming growth factor- $\beta$ » (TGF- $\beta$ ) et la fibronectine, sont exprimés par les pré-ostéoblastes. Puis, lorsque la minéralisation de la matrice est enclenchée, les ostéoblastes différenciés expriment des marqueurs tardifs de la différenciation, tels que l'ostéocalcine et la sialoprotéine osseuse.

#### *1.1.5- Cycle de remodelage osseux*

La masse osseuse est maintenue par l'équilibre entre l'activité de résorption des ostéoclastes et l'activité de formation des ostéoblastes. Ces deux processus sont coordonnés et font partie du remodelage normal de l'os (figure 1.1). La différenciation des ostéoclastes débute le cycle de remodelage osseux. Les ostéoclastes matures procèdent à la résorption de la matrice. Par la suite, les précurseurs des ostéoblastes se différencient en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes matures. Ces derniers synthétisent une matrice qui vient combler le site de résorption. Vers la fin de la période de sécrétion de l'ostéoïde, les ostéoblastes peuvent devenir des cellules bordantes, entrer en apoptose ou rester pris dans la matrice et dériver en ostéocytes reliés entre eux par un réseau d'extensions cytoplasmiques très fines logées dans des canicules.



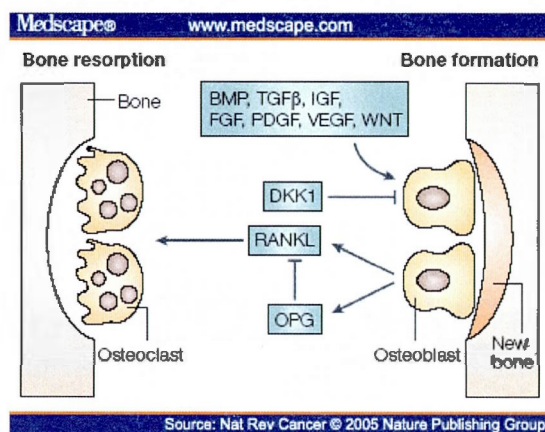


**Figure 1.1 : Cycle de remodelage osseux.** Les ostéoclastes résorbent la matrice osseuse. Le site de résorption est comblé par les ostéoblastes qui y synthétisent une matrice. Vers la fin de la période de sécrétion de l'ostéoïde, les ostéoblastes deviennent des cellules bordantes, entrent en apoptose ou dérivent en ostéocytes. (Tirée de Marie, 2001).

#### 1.1.6- Régulation du remodelage osseux

En plus de la production d'une matrice qui se minéralise par la suite, les ostéoblastes sont impliqués dans la régulation de l'activité ostéoclastique. Ils sécrètent des cytokines telles que le «macrophage colony stimulating factor» (MCS-F) aussi appelé «colony stimulating factor-1» (CSF-1) (Tanaka *et al.*, 1993), le «receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand» (RANK-L) et l'ostéoprotégérine (OPG), une molécule soluble (Logothetis et Lin, 2005). La présence de MCS-F et de la forme soluble de RANK-L est nécessaire à la formation des ostéoclastes (voir revue Miyamoto et Suda, 2002). Le M-CSF stimule la prolifération et la différenciation des cellules précurseurs des ostéoclastes par l'intermédiaire de son récepteur (c-fms), augmente la fusion des cellules mononuclées et favorise la survie des ostéoclastes (Cecchini, 1997). RANK-L, sous forme soluble ou présent à la membrane des ostéoblastes (Lacey *et al.*, 1998), se lie au récepteur membranaire

RANK des ostéoclastes, ce qui induit la formation et la différenciation des ostéoclastes et stimule l'activité des ostéoclastes matures (Toppets *et al.*, 2004). À l'opposé, l'OPG sécrétée a la possibilité de se lier à RANK-L et d'inhiber ainsi l'activation de la résorption en l'empêchant de se fixer à RANK (Gori *et al.*, 2000). (figure 1.2)



**Figure 1.2. Rôle des ostéoblastes et des ostéoclastes dans la régulation du remodelage osseux.** Les ostéoclastes (gauche), de grosses cellules multinucléées, et les ostéoblastes (droite), sont respectivement responsables de la résorption et de la formation. En plus de la production d'une matrice qui se minéralise par la suite, les ostéoblastes sont impliqués dans la régulation de l'activité ostéoclastique par l'expression de cytokines telles que RANK-L qui active la différenciation des ostéoclastes et l'OPG qui inhibe RANK-L. Les facteurs connus pour stimuler la prolifération ou la différenciation ostéoblastique sont la BMP, le TGFβ, l'IGF, le FGF, le PDGF, le VEGF et Wnt. DKK est un antagoniste de Wnt et bloque la prolifération des ostéoblastes (Tirée de Logothetis et Lin, 2005).

Les facteurs connus pour stimuler la prolifération ou la différenciation ostéoblastique sont classés en deux catégories. La première inclut ceux qui ont un effet direct sur les ostéoblastes, soient la «bone morphogenetic protein» (BMP), le «transforming growth factor-β» (TGFβ), l'«insulin-like growth factor» (IGF), le «fibroblast growth factor» (FGF), le «platelet-derived growth factor» (PDGF) et Wnt, ligand d'une

famille de glycoprotéines solubles régulant différents procédés biologiques, dont la prolifération des ostéoblastes (Logothetis et Lin, 2005). La deuxième catégorie implique les facteurs ayant un effet indirect sur les ostéoblastes, tels que la protéine Dickkopf (DKK), un antagoniste de Wnt qui bloque la prolifération des ostéoblastes. Le «vascular endothelial growth factor» (VEGF) se classe dans les deux catégories bien qu'il ait à la fois des effets directs et indirects: 1. Les ostéoblastes synthétisent le VEGF et celui-ci entraîne la différenciation ostéoblastique de façon autocrine/paracrine (effet direct). De plus, le VEGF est un facteur angiogénique qui induit la prolifération et la migration des cellules endothéliales. L'angiogénèse précède et est nécessaire à la formation osseuse (effet indirect) (Zelzer et Olsen, 2005) (figure 1.2). Tous ces facteurs modulent l'activité ostéoblastique en activant des voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la différenciation (Logothetis et Lin, 2005). Aussi, il a été démontré que lorsque survient une charge dynamique sur l'os intact, le fluide contenu dans les canicules est comprimé, ce qui stimule les ostéocytes à produire des facteurs favorisant la formation osseuse en agissant sur les ostéoblastes (Conover, 1996; Mullender *et al.*, 2004). Ces facteurs anaboliques incluent l'oxyde nitrique, des prostaglandines et d'autres petites molécules telles que l'ATP. L'oxyde nitrique, qui inhibe la résorption et favorise la formation osseuse, est généré en quelques secondes dans les ostéoblastes et les ostéocytes suite à une charge dynamique (Bakker *et al.*, 2001). De plus, des études *in vivo* ont montré que la formation osseuse induite par une charge dynamique peut être bloquée par l'indométacine, un inhibiteur de prostaglandines (Forwood, 1996), et que les antagonistes de récepteur aux prostaglandines augmentent la formation osseuse (Hagino *et al.*, 2005).

Plusieurs facteurs hormonaux sont impliqués dans le remodelage osseux. L'hormone de croissance (GH) stimule les fonctions ostéoblastiques (Slootweg, 1993). La vitamine D est hypercalcémiant. Elle est essentielle à l'absorption du calcium (Ca) dans le tube digestif et à la minéralisation osseuse pendant la croissance. Sous sa forme active, la 1,25 dihydroxycholécalférol (1,25-DHCC ou 1,25-



(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) favorise l'absorption du Ca et du phosphate en proportions égales (Toppets *et al.*, 2004). La sécrétion d'hormone parathyroïdienne (PTH), synthétisée par les glandes parathyroïdes, est associée à plusieurs mécanismes de rétro-inhibition qui ajustent la concentration du Ca sanguin. C'est une hormone hypercalcémiant dont les fonctions principales sont d'augmenter la synthèse de 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en activant la synthèse de 1-hydroxylase par les cellules des tubes rénaux, en réduisant l'activité de synthèse des ostéoblastes et en favorisant la libération d'un facteur activateur des ostéoclastes par les ostéoblastes (Toppets *et al.*, 2004). La multiplication rapide des ostéoclastes et la diminution du volume d'ostéoblastes permettent la dégradation de la matrice et la libération rapide de Ca dans le sang. À l'opposé, lorsque le taux de Ca dans le sang est anormalement élevé, les cellules parafolliculaires de la glande thyroïdes sécrètent la calcitonine. Cette hormone entraîne la formation osseuse en inhibant l'activité des ostéoclastes et en permettant la captation des ions Ca<sup>2+</sup> du sang et leur déposition dans l'os (Tortora et Grabowski, 2001). Il est à noter que l'expression de RANK-L dans les ostéoblastes est augmentée par la 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> et la PTH (Kitazawa et Kitazawa, 2001; Ma *et al.*, 2001). Ainsi, il semble que le RANK-L soit le médiateur principal de l'induction de la résorption osseuse par la PTH et la 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Horwood *et al.*, 1998). De plus, tel que démontré par Huang et son équipe (2003), la PTH inhibe l'expression génique de l'OPG quelque soit l'état de différenciation des ostéoblastes et ainsi, favorise la différenciation des ostéoclastes et la résorption osseuse.

## 1.2- CADMIUM

### 1.2.1- Propriétés chimiques et physiques

Le cadmium (Cd), du grec *kadmeia*, a été découvert en 1817, par l'Allemand Friedrich Stromeyer. Il fait partie du sous-groupe IIB du tableau périodique des éléments (tableau de Mendeleïev), tout comme le zinc (Zn) et le mercure (Hg) et son numéro atomique est le 48. Le Cd possède une masse atomique de 112,41, deux



électrons de valence sur sa dernière couche et une électronégativité de 1.7. C'est un métal blanc-argent, d'état solide à 20° Celcius. Son point de fusion se situe à 320,9° C et son point d'ébullition à 365° C. Il existe 8 isotopes naturels stables (nombre de masse : 106, 108, 110, 111, 112, 113, 114, 116), 11 isotopes instables et de nombreux isotopes métastables. Le  $^{109}\text{Cd}$  (demi-vie de 453 jours) et le  $^{115\text{m}}\text{Cd}$  (demi-vie de 43 jours) sont les plus connus.

Le Cd est un accepteur d'électrons qui peut former différents complexes dont le carbonate de Cd ( $\text{CdCO}_3$ ), le chlorure de Cd ( $\text{CdCl}_2$ ), le sulfate de Cd ( $\text{CdSO}_4$ ) et le sulfure de Cd ( $\text{CdS}$ ). Il peut également se complexer avec l'oxygène ( $\text{CdO}$ ). Le Cd peut aussi se lier avec des ligands organiques, acides aminés ou peptides, et former des complexes organiques. Le Cd est transporté dans la circulation sanguine par sa liaison aux globules rouges et aux protéines plasmatiques de haut poids moléculaire dont l'albumine ( $\text{Cd-ALB}$ ). Il peut se lier aux métallothionéines ( $\text{Cd-MT}$ ) du foie et être emmagasiné dans le foie ou transporté aux reins via la circulation systémique (Goyer et Clarkson, 2001).

### 1.2.2- Biodisponibilité et spéciation

La biodisponibilité dépend de la composition chimique et physique des particules absorbées. La biodisponibilité est considérée comme la fraction de la totalité du contaminant disponible pour l'organisme dans le milieu d'exposition qui est absorbée dans la circulation sanguine (Vig *et al.*, 2003). La forme chimique (spéciation) du Cd peut jouer un rôle déterminant dans cette biodisponibilité. Une relation directe existe entre la quantité de Cd pouvant être liée par l'organisme et la quantité de Cd pouvant potentiellement causer un effet toxique (Vig *et al.*, 2003). C'est lorsque la capacité de liaison du Cd interne est dépassée que le Cd (libre) devient toxique.

Dans l'environnement, plus de 60% du Cd se retrouve lié aux composantes organiques du sol (Krishnamurti et Naidu, 2000). Le Cd possède deux degrés d'oxydation, 0 et 2+. Il est rarement retrouvé à l'état métallique, soit au degré

d'oxydation 0 et la forme ionique  $\text{Cd}^{2+}$  est absente dans la nature due à la forte attraction qu'elle exerce sur les électrons et la présence de très nombreux ligands. Cette forme peut cependant être temporairement disponible lors d'échange de ligands. La plupart des études conduites sur la toxicité du Cd ont utilisé les sels de Cd ( $\text{CdCl}_2$  et  $\text{CdSO}_4$ ), le  $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  et du Cd lié sous forme de complexes organiques (Cd-Alb et Cd-MT) (Hinkle *et al.*, 1987; Wilson *et al.*, 1996; Tchounwou *et al.*, 2001, Pham *et al.*, 2004).

Pour nos expériences, les milieux inorganiques dits "chlorure" et "nitrate" (respectivement composés de sels chlorés et de sels nitrés) sont utilisés. Le tableau 1.1 montre les constantes de formation de complexe avec ces deux ligands ainsi que la spéciation du Cd dans ces deux milieux. La composition des milieux chlorure et nitrate est détaillée à la section Matériel et Méthodes.

**Tableau 1.1 :** Constante de complexation du Cd avec divers ligands inorganiques et spéciation du Cd en milieux chlorure et nitrate à pH 7,4.

Solution	Espèce	Log de la constante de formation de complexe $K_c$	Pourcentage du Cd total dissous
Chlorure	$\text{CdCl}^+$	1,98	61,3
	$\text{CdCl}_2$	2,60	20,7
	$\text{Cd}^{2+}$	-	14,0
	$\text{CdCl}_3^-$	2,40	1,9
Nitrate	$\text{Cd}^{2+}$	-	80,4
	$\text{CdNO}_3^+$	0,5	11,7
	$\text{CdHCO}_3^+$	13,23	5,3
	$\text{CdSO}_4$	2,37	1,7

Selon Elisma et Jumarie, 2001.

### *1.2.3- Sources naturelles d'émission*

Le Cd est présent dans la croûte terrestre et se retrouve souvent associé aux gisements de Cu et de Zn. Il est libéré dans l'environnement de façon naturelle. Il se retrouve dans les rivières lors de l'usure des roches cadmifères et se retrouve dans l'atmosphère lors de feux de forêts et d'éruptions volcaniques (Gouvernement du Canada *et al.*, 1994).

### *1.2.4- Sources anthropiques d'émission*

L'industrialisation rapide, les pratiques modernes d'agriculture et les méthodes fautives de disposition des déchets ont fait grimper la concentration de Cd dans l'environnement, pouvant causer de graves problèmes de toxicité pour tous les organismes vivants, incluant les humains. Depuis les cinq dernières décennies, la libération de Cd a atteint 22 000 tonnes annuellement à l'échelle mondiale, chiffre qui inclut les sources d'émission naturelles (Singh *et al.*, 2003).

Le Cd est un sous-produit de l'extraction minière du Zn, du cuivre (Cu) et du plomb (Pb) mis en circulation par les procédés de fonte et d'affinage des industries métallurgiques. De plus, il est utilisé dans les piles rechargeables Ni-Cd, dans certains alliages, comme pigments pour la peinture, le plastique, le verre, la céramique et pour ses propriétés anticorrosives (Jarüp, 2003).

La production de fertilisants non naturels à base de phosphate est une autre source importante de Cd. Suite à l'application d'engrais sur les terres agricoles, une partie du Cd se retrouve dans le sol (Satarug *et al.*, 2003). De plus, les déchets contenant du Cd, produits par les entreprises de fertilisants, sont rejetés dans les eaux de surfaces.

### *1.2.5- Voies d'exposition et mécanismes de toxicité*

Bien que plusieurs métaux soient essentiels à la santé des organismes vivants, le Cd ne possède aucune fonction physiologique connue et ne fait donc pas partie des oligo-éléments. C'est un ion métallique utilisé dans l'industrie et considéré toxique

pour la population générale. Il a une demi-vie chez l'humain de plus de 10 ans et s'accumule dans le corps au fil du temps (Goyer, 1996) dû à l'absence de procédé biochimique actif pour l'éliminer efficacement (Satarug *et al.*, 2003). Le Cd est extrêmement réactif avec les groupements thiols, peut prendre la place du Zn dans certaines enzymes et entrer en compétition avec le Ca pour les canaux calciques et les protéines de liaison intracellulaire (Hinkle *et al.*, 1987). Différentes études ont présenté le Cd comme étant un carcinogène de type I (IARC, 1993) et un tératogène. Une substance est classée carcinogène de type I lorsqu'elle a été démontrée comme étant cancérigène pour les humains. L'exposition aiguë à de fortes doses peut entraîner des dommages à plusieurs organes tels que les poumons, le tractus gastro-intestinale, les ovaires, les testicules et les os (Goyer, 1996).

Pour la population générale non-fumeuse, la voie orale (alimentation) constitue la principale source d'exposition. Le foie, les moules, les huîtres, les crevettes, les langoustines, les champignons, la poudre de cacao et les algues séchées sont quelques-uns des aliments connus comme étant riches en Cd. Le poisson, les mollusques et les crustacés peuvent bioaccumuler le Cd (Satarug *et al.*, 2003).

#### *1.2.6- Cadmium et toxicité pulmonaire*

Les poumons constituent la principale voie d'absorption du Cd chez les fumeurs et les travailleurs qui inhalent des poussières et des émanations contenant du Cd. Comme plusieurs végétaux, le tabac (*Nicotiana sp.*) a la propriété de concentrer le Cd présent dans le sol. La teneur du tabac en Cd peut varier entre 1-2 µg/g de poids sec, ce qui correspond à un contenu 0.5-1 µg/cigarette (Satarug et Moore, 2004). Environ 10% de ce Cd est inhalé (Goyer, 1996). L'oxyde de Cd (CdO) généré par la combustion du tabac est fortement biodisponible. Environ 10% de l'oxyde de Cd inhalé est déposé dans les tissus pulmonaires et 30-40% est absorbé dans la circulation systémique du fumeur (Satarug et Moore, 2004). Il semble que les fumeurs possèdent des niveaux de Cd sanguin et rénal respectivement de 3 à 4 fois et de 2 à 3 fois plus élevés que les non-fumeurs (Satarug et Moore, 2004).



### *1.2.7- Cadmium et toxicité rénale*

Le Cd peut se lier aux métallothionéines (Cd-MT) du foie et être transporté aux reins via la circulation systémique. Une fois dans les reins, les complexes Cd-MT sont emmagasinés dans les lysosomes où ils seront catabolisés. Le Cd ainsi libéré peut à nouveau se lier aux MTs intracellulaires ou induire de la néphrotoxicité (Goyer et Clarkson, 2001).

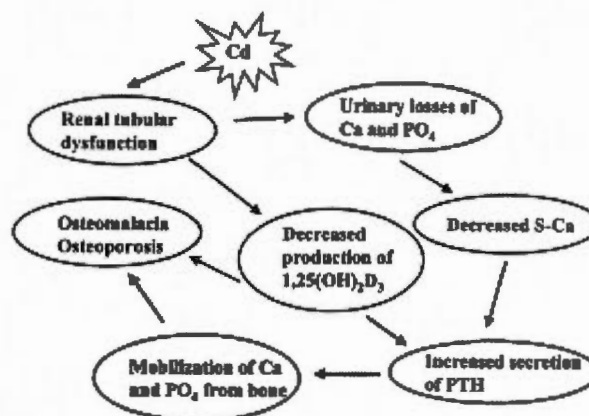
Environ la moitié de la quantité de Cd accumulée dans le corps est présente dans les reins. De fortes expositions à long terme causent des dommages rénaux principalement aux cellules du tubule rénal et du glomérule (Berglund *et al.*, 2000). Le Cd est responsable d'un dysfonctionnement du tubule proximal (segments S1 et S2) et de dommages pouvant être caractérisés par l'augmentation de l'excrétion urinaire de glucose, d'acides aminés et de Ca suite à une capacité affaiblie de réabsorption (Goyer, 1996).

### *1.2.8- Effets indirects du cadmium sur le métabolisme osseux*

Le cas le plus connu de l'effet toxique du Cd sur la santé osseuse est celui de la maladie Itaï-itaï qui a fait son apparition vers 1912, au Japon, suite à la contamination d'une zone de 1500 hectares le long de la rivière Jinzu (ICETT, 1998). Les fermiers de la région faisaient usage de l'eau provenant de la rivière afin d'irriguer leurs rizières. L'ICETT (1998) rapporte que le Cd origine des «décharges en amont de la rivière Jinzu, provenant des activités commerciales de la Kamioka Mining Co., Ltd, à leurs mines de Kamioka». Ce faisant, le Cd s'est concentré dans le riz, principal aliment des habitants de la région. Le rapport mentionne également que les femmes ont été les plus affectées, souffrant de douleurs chroniques aux os, d'où l'origine du nom Itaï-itaï byo (maladie «aie-aie»). Dû au fait que la maladie était considérée comme endémique, de franches recherches visant à en expliquer les causes n'ont été entamées que vers 1950. Ce n'est qu'en 1968 que le Ministère de la Santé et du Bien-être au Japon annonce que «la maladie Itaï-itaï est causée par une intoxication chronique au Cd». Cette maladie «porte atteinte premièrement aux

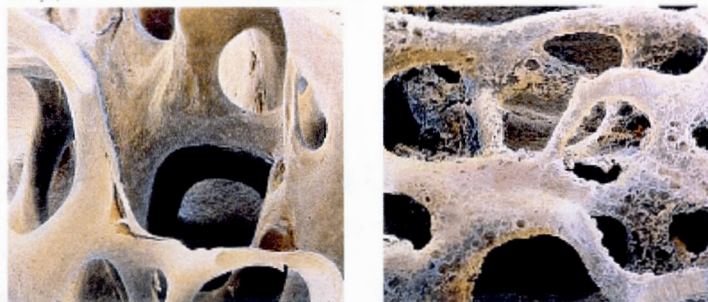
fonctions rénales et cause progressivement de l'ostéomalacie. Les victimes souffrent de déficience en Ca, comme dans les cas de malnutrition, de vieillissement, de déficience hormonale et d'allaitement déficient.

Le Cd étant principalement accumulé dans les reins (demi-vie  $\cong$  30 ans) (Berglund *et al.*, 2000), plusieurs mécanismes ont été suggérés afin d'expliquer les effets indirects du Cd sur le remodelage osseux (figure 1.3). Buchet et ses collègues (1990) ont observé que lorsque la concentration critique de Cd est atteinte, un dysfonctionnement du tubule proximal survient, caractérisé par une protéinurie de faible poids moléculaire. De plus, l'augmentation de l'excrétion du Ca observée suggère une altération dans le métabolisme du Ca (Järup *et al.*, 1998). Nogawa *et al.* (1987) ont observé que le taux sérique de vitamine 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> est plus bas chez les patients atteints de la maladie Itai-itai ou exposés au Cd et présentant des dommages rénaux. De plus, une augmentation des concentrations sériques de PTH et de B2-microglobuline a été observée. Cette étude suggère que le Cd entraîne des dommages aux reins et que cette néphrotoxicité est responsable d'effets indirects aux os *via* une altération du métabolisme de la vitamine D et de la PTH. Ces effets indirects se manifestent par des douleurs aux os, de l'ostéoporose (amincissement et fragilisation des os; figure 1.4) et/ou de l'ostéomalacie (os "mou" qui résulte d'une insuffisance de minéralisation de la substance ostéoïde) (Goyer et Clarkson, 2001). Ces modifications osseuses sont également reliées à la perte urinaire de Ca (Goyer et Clarkson, 2001) observée à des niveaux subtils de dysfonctionnement tubulaire, soit sans modification au niveau de la vitamine D et de la PTH (Buchet *et al.*, 1990; Järup *et al.*, 1998). De plus, en Suède, chez des travailleurs d'une usine fabriquant des piles, une relation quantitative a été clairement démontrée entre l'excrétion urinaire de Cd et de protéine HC (alpha-1-microglobuline), un marqueur de dysfonctionnement tubulaire rénal (Järup *et al.*, 1995, 1998), et l'exposition au Cd. Les hommes affichant des signes de protéinurie avaient également une plus faible densité osseuse.



**Figure 1.3 : Effets indirects du Cd sur les os résultant d'un dysfonctionnement tubulaire rénal.** Lorsque la concentration critique de Cd rénale est atteinte, un dysfonctionnement du tubule proximal survient, caractérisé par une protéinurie de faible poids moléculaire. L'augmentation de l'excrétion du calcium (Ca) est observée ce qui suggère une altération dans le métabolisme du Ca. La PTH entraîne la hausse du niveau de Ca plasmatique par la stimulation de la résorption osseuse, la réabsorption tubulaire rénale et la synthèse de vitamine D active dans le rein. En même temps, la PTH fait diminuer la concentration de phosphate (PO<sub>4</sub>) plasmatique par l'inhibition de sa réabsorption tubulaire. L'activation normale de la vitamine D sous forme 1,25(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> dans le rein peut être réduite et conduire à une diminution de l'absorption de Ca par l'intestin, affectant ainsi la minéralisation osseuse (tirée de Berglund *et al.*, 2000).

Photographs © 2005 P. Motta, Science Source/Photo Researchers



**Figure 1.4. Ostéoporose : Amincissement et fragilisation de l'os.** À gauche, la substance osseuse normale. À droite, la substance osseuse d'une personne atteinte d'ostéoporose.



### 1.2.9- Effets directs du cadmium sur le métabolisme osseux

Les effets indirects du Cd sur les os via une atteinte rénale sont bien documentés. Cependant, des rats exposés à de faibles concentrations de Cd présentent des dommages aux os bien avant que des signes de dysfonctionnement rénal soient observés (Ohta *et al.*, 2000). Malgré ces observations, peu d'informations sont disponibles sur le mécanisme d'action directe du Cd, soit au niveau cellulaire, sur le métabolisme osseux.

Wilson et ses collègues (1996) ont étudié l'effet du Cd sur la formation et l'activité des ostéoclastes *in vitro*. Leurs résultats démontrent que le Cd (10-100 nM) accélère la différenciation de nouveaux ostéoclastes à partir de cellules progénitrices et active ou augmente l'activité des ostéoclastes matures. De plus, les études de Miyahara *et al.* (1992), conduites sur des cultures d'os pariétal de souris nouveau-nés, ont démontré que le Cd (0,5  $\mu$ M) stimule la résorption osseuse par les ostéoclastes en réponse à la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), un médiateur de la réponse inflammatoire synthétisé par les ostéoblastes. Également, il a été montré que l'administration de doses en deçà de 30  $\mu$ M de Cd dans la moelle osseuse inhibe la différenciation des ostéoblastes de rat et de souris par un effet direct. Cette inhibition se traduit, dans les cellules de la moelle osseuse, par la baisse du contenu en Ca, en phosphore et du contenu en «vitamin K-dependent Gla-containing protein», protéine reliée à la minéralisation, ainsi qu'à une diminution de l'activité phosphatase alcaline (Dohi *et al.*, 1993).

## 1.3- VOIES D'ENTRÉE DU CADMIUM

### 1.3.1-Transport du cadmium dans les cellules

Il existe très peu d'informations sur les voies d'entrée et la façon dont le Cd peut gagner l'intérieur des cellules. Différentes hypothèses ont été proposées (voir revue Zalups et Ahmad, 2003) et une de ces hypothèses stipule que le Cd peut former des liaisons avec les groupements thiol de protéines de faible poids moléculaire ou



d'acide aminé, par exemple avec le GSH ou la cystéine. Les conjugués obtenus imitent ou servent d'homologues moléculaires sur les sites de protéines de transport spécifiques, impliquées normalement dans le transport d'acides aminés, d'oligopeptides, d'anions ou de cations organiques ou d'autres molécules importantes pour le maintien de l'homéostasie. Une autre hypothèse avance que le Cd sous forme ionique pourrait entrer dans certains épithéliums par endocytose de protéines contenant du Cd. Cependant, l'hypothèse qui s'approche le plus de nos intérêts est celle qui propose que l'entrée sélective du Cd dans la cellule implique, du moins en partie, qu'il interagisse et entre en compétition avec d'autres éléments essentiels (ex. : Ca, Fe, Zn) pour des sites de liaisons sur des protéines membranaires, probablement par mimétisme.

Ici, le mimétisme ionique ou l'homologie réfère aux situations où la forme ionique divalente du Cd ( $\text{Cd}^{2+}$ ) peut servir comme un homologue fonctionnel de la forme ionique divalente d'autres éléments transportés par des protéines spécifiques. Ainsi, en tenant compte du fait que le Cd et le Ca possèdent un rayon atomique similaire (0,99 et 0,97 Angström) et qu'il a été démontré que le  $\text{Cd}^{2+}$  inhibe significativement l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par les canaux calciques dans les cellules excitables (Lansman *et al.*, 1986; Taylor, 1988), le  $\text{Cd}^{2+}$  peut être vu comme faisant du mimétisme ionique ou en tant qu'homologue du  $\text{Ca}^{2+}$  pour certains types de canaux calciques.

### *1.3.2- Implication des systèmes de transport du calcium, du fer et du zinc dans le transport de Cd*

Avant d'exercer un effet toxique sur les ostéoblastes, le Cd doit entrer dans la cellule, et ce, par un mécanisme qui n'est pas encore élucidé. Une des hypothèses suggérées dans ce projet, basée sur les observations faites sur des cellules hypophysaires par Hinkle et son équipe (1987), est que le Cd emprunterait les canaux calciques voltage-dépendants (VDCC) pour pénétrer les ostéoblastes. En effet, il

semble qu'il y ait interférence dans le transport de Ca en présence de Cd dans une variété de cellules dont la lignée hépatique fœtale humaine WRL-68 (Souza *et al.*, 1996) et la lignée PC12 provenant d'un phéochromocytome de rat (tumeur de la médullosurrénale) (Hinkle et Osborne, 1993; Shafer, 1998). D'autres voies d'entrée du Ca, i.e. certains canaux appartenant à la superfamille TRP («transient receptor potential»), sont également explorés dans ce projet comme potentiellement impliqués dans le transport du Cd.

D'autres études ont mentionné des transporteurs potentiels de Cd qui n'impliquent pas des voies calciques. Ces transporteurs ne sont pas explorés dans ce projet, mais nous croyons important de les mentionner. Des recherches faites sur des cellules entérocytaires font état du transporteur de métaux NRAMP2, aussi appelé DMT1, comme étant impliqué dans l'absorption intestinale de  $\text{Cd}^{2+}$  (Elisma et Jumarie, 2001; Tallkvist *et al.*, 2001). Palmiter et Findley (1995) ont également identifié un transporteur de Zn, ZNT1, dans la membrane basolatérale des entérocytes sans pour autant le suggérer comme étant impliqué dans le transport de Cd. Finalement, Cragg et son équipe (2001) ont suggéré qu'un autre transporteur de Zn, ZTL1, situé à la membrane luminale des entérocytes, serait impliqué dans l'influx de  $\text{Cd}^{2+}$ .

### *1.3.3- Canaux calciques voltage-dépendants*

Le Ca agit comme un second messenger impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires (Berridge *et al.*, 2000). Les VDCC, aussi appelés VOCC (voltage-operated calcium channel) et VSCC (voltage-sensitive calcium channel), permettent l'entrée de Ca dans les cellules en réponse à la dépolarisation membranaire. Ils ont été décrits dans le cerveau, le cœur et les muscles squelettiques où ils sont présents en grandes quantités (Ahlijanian *et al.*, 1990 ; Catterall, 1995). Plusieurs sous-types de VDCC, soit L, N, P, Q, R et T, ont été identifiés (Catterall, 2000). Les VDCC sont généralement caractérisés par une activation dépendante de la dépolarisation membranaire, une perméabilité sélective pour le  $\text{Ca}^{2+}$  en tant qu'ion

physiologique et sont modulés par les protéines G, la calmoduline, les seconds messagers diffusibles et les protéines kinases (Tsien et Tsien, 1990 ; Catterall, 1995).

Dans une étude utilisant la lignée cellulaire hypophysaire GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub>, Hinkle *et al.* (1987) décrivent deux types (L et T) de VDCC comme étant responsables de l'entrée de Cd en réponse à la dépolarisation membranaire. Les VDCC de type L possèdent une inactivation lente et se distinguent par un seuil d'excitation élevé, une forte conduction (propagation) et une sensibilité à des substances antagonistes appartenant aux dihydropyridines. L'autre classe de VDCC, soit le type T, est caractérisée par un seuil d'excitation plus faible, une inactivation rapide et une insensibilité relative aux dihydropyridines.

Les résultats de Hinkle *et al.* (1987) démontrent que les différentes classes d'antagonistes des VDCC (dihydropyridines tel le nifédipine, phenylalkylamines tel le vérapamil et benzothiazepines tel le diltiazem) utilisées ont un effet protecteur sur les cellules en diminuant l'entrée du Cd. L'utilisation de ces bloqueurs a pour effet d'augmenter la CL<sub>50</sub> (concentration létale pour 50% des cellules exposées) du Cd. De façon contraire, l'utilisation de Bay K8644, un agoniste des VDCC de type L, fait diminuer la CL<sub>50</sub> observée. Ainsi, ces résultats suggèrent que les VDCC permettent l'entrée du Cd dans les cellules hypophysaires et seraient donc majoritairement responsables de son effet cytotoxique. De plus, le type L constituerait la voie majeure d'entrée du Cd dans les cellules GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub>. Bien que le flux de Cd entrant par les VDCC soit extrêmement faible comparativement à celui du Ca (1% du flux de Ca), cela semble suffisant pour permettre l'entrée d'une dose toxique (Hinkle *et al.*, 1987). Observation intéressante, selon ces mêmes auteurs, le Ca interfère avec l'accumulation de Cd puisqu'un milieu avec une forte concentration en ions calciques protège contre la toxicité cellulaire du Cd. De plus, dans des cultures primaires d'hépatocytes de rat, l'inhibition, à l'aide de vérapamil, de l'entrée de Ca induite par la progestérone entraîne une diminution de la toxicité du Cd (Baker *et al.*, 2003).

Ces deux types de canaux (L et T) ont également été identifiés dans les ostéoblastes de rats (Gu *et al.*, 1999), de souris (Hattori *et al.*, 2001) et dans des



cellules humaines du mésenchyme en différenciation ostéogénique (Zahanich *et al.*, 2005). De plus, la caractérisation du transport de Cd dans des fibroblastes a mené à l'identification d'un canal calcique voltage-dépendant de type T, le  $\text{Ca}_v\alpha_{1G}$  comme étant potentiellement impliqué dans l'entrée de  $\text{Cd}^{2+}$  (Leslie *et al.*, 2002). Barry (2000) a démontré la présence d'ARNm de VDCC de type L, entre autre, dans des lignées ostéoblastiques humaines, dont les MG-63 et les SaOS-2, des modèles utilisés dans ce projet.

Cependant, au potentiel de repos des cellules, en conditions basales, les VDCC seraient principalement fermés lorsque la membrane n'est pas dépolarisée. Ils ne peuvent donc être considérés comme impliqués dans l'influx basal de Cd. Ainsi, il a été démontré que la PTH, dont le rôle est d'augmenter la réabsorption rénale de Ca, stimule l'entrée de Cd dans la lignée de cellules rénales MDCK (Flanagan et Friedman, 1991). Dans des cellules du tubule contourné distal, il a été observé que l'entrée basale de Cd n'est pas modifiée par la présence de bloqueurs de VDCC, alors que l'entrée de Cd stimulée par la PTH est inhibée par ces mêmes bloqueurs (Friedman et Gesek, 1994). De plus, la perméabilité du Cd au travers des canaux de type L a été rapportée comme étant extrêmement faible comparativement à celle du Ca (Tsien *et al.*, 1987) et le Cd est habituellement connu comme un bloqueur de canaux calciques. Ainsi, nous croyons que les VDCC en conditions basales ne seraient pas responsables de l'influx cellulaire de Cd, quoique, lors d'une dépolarisation membranaire, ils pourraient contribuer en proportion limitée à augmenter l'influx de Cd.

#### 1.3.4- Canaux TRP

Considérant qu'il semble qu'une interférence pour le transport existe entre le Cd et le Ca dans une variété de cellules, les canaux TRP («transient receptor potential»), des canaux transportant le Ca, pourraient constituer des voies d'entrée du Cd.

Tous les TRP contiennent six domaines transmembranaires et s'assemblent en homo- ou en hétéro-tétramères pour former des canaux ioniques. Les TRP sont des canaux cationiques, bien que leur sélectivité pour différents cations monovalents ou divalents varie énormément entre les isoformes (Pedersen *et al.*, 2005). La plupart sont perméables au  $\text{Ca}^{2+}$  et quelques-uns au magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ). Ils sont en partie responsables de la variation de la concentration intracellulaire de Ca.

La superfamille des canaux TRP est divisée en sept sous-classes selon l'homologie de leurs séquences en acides aminés : TRPC («Canonical»), TRPM («Melastatin»), TRPV («Vanilloid»), TRPA («Ankyrin»), TRPP («Polycystin»), TRPML («Muculipin») et TRPN («no mechanoreceptor potential C, ou NOMPC») (Montell *et al.*, 2002; Moran *et al.*, 2004). Les canaux TRPC contiennent 7 membres (TRPC1-7) exprimés à divers degrés dans différentes cellules (Vennekens *et al.*, 2002). Les sous-familles TRPM et TRPV regroupent respectivement huit et six différents canaux (TRPM1-8 et TRPV1-6). La sous-famille TRPML comprend 3 membres alors que celle des TRPP en compte trois «channel-like» et cinq «non-channel» (Pedersen *et al.*, 2005). Ces deux sous-familles ne sont pas encore bien connues. La sous-famille TRPA ne possède qu'un membre présent chez les mammifères (TRP1) et finalement, la sous famille TRPN n'a été détectée jusqu'à présent que chez le nématode (*Caenorhabditis elegans*), la drosophile (*Drosophila sp.*) et le poisson zèbre (*Danio rerio*) (Pedersen *et al.*, 2005).

Les résultats obtenus à notre laboratoire à l'aide de la technique RT-PCR démontrent que: i) les TRPM 3, 6, 7 et 8 sont exprimés par les lignées ostéoblastiques humaines MG-63, U2OS et SaOS-2; ii) les TRPC 1, 3, 4 et 6 sont exprimés par les lignées MG-63 et SaOS-2, quoique les TRPC6 n'affichent qu'un très faible signal; iii) les TRPC1 et 3 sont exprimés par la lignée U2OS. De plus, les TRPC1, 3 et 4 ont été identifiés par la technique de transfert de type Western (immunobuvardage) pour la lignée MG-63 (Moreau *et al.*, données non publiées). Également, Monteilh-Zoller et son équipe (2003) ont démontré que les canaux TRPM7, bien qu'ils soient responsables du maintien de l'homéostasie intracellulaire de  $\text{Mg}^{2+}$ , ne fournissent pas

seulement une voie d'entrée cellulaire pour le  $\text{Ca}^{2+}$  et le  $\text{Mg}^{2+}$ , mais sont aussi responsables de l'influx d'ions métalliques divalents dont le  $\text{Cd}^{2+}$  selon cette séquence de perméabilité décroissante :  $\text{Zn}^{2+} \sim \text{Ni}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$ .

En général, les TRPC sont des canaux cationiques non-sélectifs perméables au  $\text{Ca}^{2+}$ . Les mécanismes ROC («receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry») et SOC («stored-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry») ont tous deux été proposés pour tous les membres appartenant aux TRPC (Pedersen *et al.*, 2005). Le mécanisme ROC est le suivant : la PLC (phospholipase C), activée par des récepteurs couplés à la protéine G ou des récepteurs à activité tyrosine kinase, produit du DAG (diacylglycérol) qui active directement les canaux TRP et de l' $\text{IP}_3$  (inositol 1,4,5-triphosphate) qui induit la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  des réserves intracellulaires du RE (réticulum endoplasmique) vers le cytoplasme ce qui active à son tour les canaux TRP par des facteurs qui ne sont pas encore connus (Pedersen *et al.*, 2005; Ramsey *et al.*, 2006). Bien que les mécanismes ROC et SOC impliquent tous les deux la déplétion des réserves de  $\text{Ca}^{2+}$ , la production de DAG ne fait pas partie du mécanisme SOC (Pedersen *et al.*, 2005). Les canaux TRPC sont largement exprimés et un seul type cellulaire contient généralement plusieurs TRPC (Montell *et al.*, 2002). Récemment, l'expression des canaux TRPC3 a été rapportée dans les ostéoblastes de rat (Baldi *et al.*, 2003).

#### 1.3.5- Transporteur NRAMP2

NRAMP2 («natural resistance-associated macrophage protein 2») est une glycoprotéine appartenant à une petite famille de transporteurs de fer intégrés à la membrane, exprimés dans la plupart des tissus et pouvant, grâce à leur large sélectivité, transporter plusieurs autres métaux (Gruenheid *et al.*, 1995). NRAMP2, aussi appelé DMT1 («divalent metal transporter») qui est l'homologue humain de DCT1 («divalent cation transporter») chez le rat, joue un rôle vital dans le métabolisme du fer. En plus d'être exprimé dans les entérocytes, ce transporteur est



exprimé dans les hépatocytes et par une variété de cellules de l'épithélium tubulaire du rein. Il est aussi exprimé dans les poumons, le cœur, le cerveau et les testicules (Gunshin *et al.*, 1997). NRAMP2 est en fait un co-transporteur  $\text{Fe}^{2+}:\text{H}^+$ , reconnu comme étant fonctionnel en présence d'un gradient de protons seulement. Il est à noter que l'implication de ce cotransporteur dans le transport intestinal du Cd sous forme ionique ( $\text{Cd}^{2+}$ ) a été démontrée (Elisma et Jumarie, 2001; Tallkvist *et al.*, 2001; Bannon *et al.*, 2003; Okubo *et al.*, 2003; Ryu *et al.*, 2004). Son implication physiologique est pertinente sachant que le pH intestinal luminal est de l'ordre de 6-6,5.

#### 1.3.6- Concentration létale moyenne dans différents types cellulaires

Le Cd ne possède aucune fonction physiologique connue à ce jour. Bien que sa toxicité ait été étudiée dans plusieurs types cellulaires, à notre connaissance, aucune étude n'a caractérisée la  $\text{CL}_{50}$  du Cd pour les ostéoblastes. Dehn *et al.* (2004) ont obtenu une  $\text{CL}_{50}$  de 6,2  $\mu\text{M}$  pour la lignée d'hépatocytes HepG<sub>2</sub> après 24 heures mesurée à l'aide de l'essai MTT. Pour la même lignée et à l'aide du même essai, Tchounwou *et al.* (2001) ont obtenu une  $\text{CL}_{50}$  plus élevée de  $6,1 \pm 0,8 \mu\text{g/ml}$  après 48 heures, ce qui équivaut à  $33,3 \pm 4,4 \mu\text{M}$  considérant le poids moléculaire de 183,32 g/mol du  $\text{CdCl}_2$  qui est la forme généralement utilisée. L'essai «neutral red» réalisé sur la lignée de cellules épithéliales intestinales I-407 a permis à Keogh et son équipe (1994) d'obtenir une  $\text{CL}_{50}$  de 53  $\mu\text{M}$  après 48 heures d'exposition au Cd. La mesure de protéine des cellules adhérentes effectuée sur la lignée hypophysaires GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> a permis d'obtenir une  $\text{CL}_{50}$  de 15  $\mu\text{M}$  après 72 heures d'exposition (Hinkle *et al.*, 1987). Par un essai utilisant le réactif d'Owen pour déterminer la quantité de formazan produite par des cellules épithéliales hépatiques de rat (TRL 1215), Qu et ses collègues (2005) sont arrivés à une  $\text{CL}_{50}$  de  $3,5 \pm 0,4 \mu\text{M}$  après 24 heures d'exposition. Sauer et son équipe (1997) ont obtenu, à partir d'une culture primaire d'hépatocyte de rat, une  $\text{CL}_{50}$  de  $1,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$  après 18 heures d'exposition, par la

méthode LDH relâchée («lactate dehydrogenase leakage»). Ainsi, pour l'ensemble de ces mesures portant sur des expositions de 18 à 72 heures, les valeurs de  $CL_{50}$  varient de 1 à 33  $\mu M$ . Seule la lignée I-407 semble être étonnamment résistante au Cd avec une  $CL_{50}$  évaluée à 53  $\mu M$ .

#### 1.4— MÉCANISMES DE PROTECTION CELLULAIRE CONTRE LA TOXICITÉ DU CADMIUM

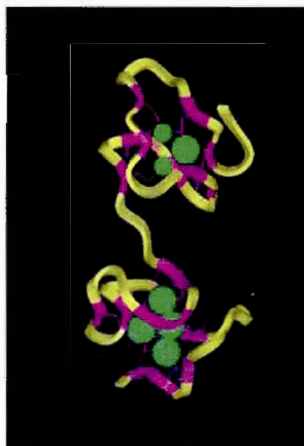
##### *1.4.1- Aperçu général des mécanismes de protection*

Plusieurs mécanismes de défense contre les agents toxiques sont retrouvés au sein de la cellule. Contre la toxicité du Cd, trois principales stratégies sont bien documentées. La présence et l'induction de l'expression des métallothionéines (MTs) en tant que protéines de liaison aux métaux constituent l'une de ces stratégies. Également, l'induction de l'expression du groupe des protéines HSP70 est reconnue comme un mécanisme de défense cellulaire contre différents contaminants. Finalement, le glutathion intervient en formant des conjugués avec le Cd par le biais de son groupement thiol.

##### *1.4.2- Métallothionéines*

D'après Eaton et Klaassen (1996), le Cd est bien connu pour produire une tolérance dispositionnelle acquise. La tolérance acquise est l'état caractérisé par la diminution de la réponse à un effet toxique d'une substance suite à une exposition primaire à cette substance ou à une substance de structure similaire. La tolérance dispositionnelle conduit à la diminution de la quantité de la substance toxique qui rejoint le site où l'effet toxique est produit. Ce mécanisme de tolérance au Cd est lié à la synthèse de MTs. Ainsi, la liaison du Cd aux MTs provoque la diminution de sa toxicité.





**Figure 1.5. Structure de la métallothionéine.** En vert, sept ions Cd. En rose, cystéines. En jaune, autres acides aminés de la protéine. Le domaine  $\beta$  (en haut de la figure) et le domaine  $\alpha$  (en bas) sont reliés entre eux par un enchaînement flexible de deux résidus lysine centraux.

Les MTs, découvertes en 1957 (Margoshes et Vallee), sont une famille de protéines de très faible poids moléculaire (environ 6000 Da) qui occupent diverses fonctions dont le maintien de l'homéostasie de métaux essentiels et la protection contre la toxicité de nombreux métaux. Cette apoprotéine possède deux domaines ( $\alpha$  et  $\beta$ ) reliés entre eux par un enchaînement flexible de deux résidus lysine centraux (figure 1.5). Les MTs contiennent de 18 à 23 résidus cystéine et aucun acide aminé aromatique ou histidine (Coyle *et al.*, 2002). Elles sont riches en cystéines (ligand thiol), ce qui leur confère une très grande affinité de liaison pour les métaux lourds, principalement le Zn, le Cu et le Cd. Dans le cas du Cd, sept ions par molécule de MT peuvent être liés. Cette liaison rend le métal inactif biologiquement. Conséquemment, la portion toxique du métal est équivalente à sa portion non liée. Ainsi, les cellules ayant un niveau nul de MT sont plus susceptibles à la toxicité induite par des produits chimiques (Zheng *et al.*, 1996). Des études faites sur des souris MT knock-out ont également montré une plus grande sensibilité à l'hépatotoxicité et la létalité induite par des expositions aiguës au Cd.

*In vivo* de même qu'*in vitro*, l'induction de MTs observée après une première exposition au Cd protège contre des expositions subséquentes à des doses plus

élevées (mécanisme de tolérance) (Goldstein et Schnellmann, 1996). Ainsi, il a été montré dans plusieurs types de cellules résistantes au Cd qu'une augmentation de l'expression des gènes codant pour les MTs survient suite à une exposition au Cd bien qu'elles possèdent déjà toutes des niveaux élevés de MTs (Michalska et Choo, 1993; Masters *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1995; Klaassen et Liu, 1998; Coyle *et al.*, 2000, Beattie *et al.*, 2005). La régulation de la synthèse des MTs se fait au niveau transcriptionnel (Amiard et Cosson, 1997).

La transcription des gènes codant pour les MTs est activée par le facteur-1 de transcription en réponse aux métaux (MTF-1). La protéine MTF-1 se lie, via ses doigts de Zn, en position *cis* d'une courte séquence d'ADN appelée élément de réponse aux métaux (MRE) et présente dans la région du promoteur des gènes visés (MTs) (Stuart *et al.*, 1984). L'expression des MTs peut être induite par des concentrations faibles et non toxiques de métal et d'autres stimuli tels que le stress oxydatif, l'hypoxie ou les radiations ionisantes (Kuwahara *et al.*, 2002). Les animaux préalablement exposés au Cd ont des concentrations mesurables de MTs dans la circulation (Amiard et Cosson, 1997). Bien que le foie soit l'organe qui possède la plus grande capacité d'induction de MTs, d'autres organes peuvent aussi les surexprimer. Kimura et ses collègues (1998) ont observé que, chez des rats exposés au Cd, la plupart du Cd présent dans les reins était lié aux MTs, alors que seulement 20% du Cd présent dans les os était lié aux MTs. Des protéines s'apparentant aux MTs étaient induites dans les os de rats traités au Cd, mais le contenu en cystéine de ces protéines était plus faible que celui retrouvé dans les MTs du foie (Kono *et al.*, 1981). Cependant, Oda et son équipe (2001) ont clairement démontré la présence de MTs (MT-I et MT-II) dans le cytoplasme et le noyau de cellules osseuses de rat.

#### 1.4.3- HSP70

Le groupe protéinique de haut poids moléculaire HSP70 («Heat-shock proteins»; 70 kDa) appartient à la famille des protéines de stress qui sont induites suite à différents états pathophysiologiques tels qu'un choc thermique, un stress

oxydatif, une intoxication, une exposition aux métaux lourds et un traumatisme tissulaire. L'expression de toutes les classes de HSP inductibles se fait sous le contrôle transcriptionnel du «Heat-shock factor 1» (HSF1). HSF1 est un facteur de transcription exprimé de façon constitutive sous forme de monomère dans le cytoplasme des cellules humaines. Il s'homotrimérise en réponse au stress pour pouvoir se lier à l'ADN (Wu, 1995). Il se lie à un site du promoteur connu sous le nom de «Heat-shock element» (HSE) (Pelham, 1982). Cependant, la liaison de HSF1 à l'ADN est insuffisante pour induire la transcription. La transcription complète requière l'hyperphosphorylation de HSF1 (Holmberg *et al.*, 2001).

Les membres de la famille HSP70, aussi présents chez les bactéries, siègent dans le cytosol et les organites des cellules eucaryotes. La distribution individuelle des protéines de stress varie entre les différents types cellulaires (Georing *et al.*, 2000). L'induction des HSP70 pour les cellules ostéoblastiques MG-63 a été démontrée par l'utilisation de chocs thermiques (Li *et al.*, 1999). De plus, quelques études ont démontré que l'exposition au Cd entraîne une augmentation de l'expression cellulaire de HSP70 dans les hépatocytes (Souza *et al.*, 2004; Farzaneh *et al.*, 2005; Urani *et al.*, 2005). Il semble que ces protéines, en tant que chaperons moléculaires, jouent un rôle important dans le maintien de la structure normale des protéines et/ou dans la dégradation de protéines endommagées, et donc procurent un mécanisme de défense contre la toxicité et/ou facilitent le rétablissement et la réparation (Goldstein et Schnellmann, 1996) et permettent d'éviter l'apoptose cellulaire.

#### 1.4.4- Glutathion

Le système GSH est probablement le mécanisme de défense cellulaire contre le stress oxydatif le plus important qui existe dans la cellule. Le glutathion est un tripeptide formé d'acide glutamique, de cystéine et de glycine ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) qui n'agit pas seulement comme un éboueur d'espèces réactives de l'oxygène («ROS



scavenger»), mais possède aussi des fonctions dans la régulation du statut redox intracellulaire (Curtin *et al.*, 2002). Ce système comprend le glutathion sous forme réduite (GSH) et sous forme oxydée (GSSG), la glutathion peroxydase et la glutathion réductase. En conditions normales, plus de 95% du GSH intracellulaire est sous forme réduite (Curtin *et al.*, 2002). Ainsi, sa déplétion entraîne la diminution de la capacité réductrice de la cellule ce qui peut résulter en l'induction de stress oxydatif sans l'intervention de ROS exogènes (Fernandes et Cotter, 1994). Le GSH est aussi considéré comme faisant partie d'un mécanisme général de détoxification des substances toxiques électrophiles par la conjugaison directe avec le glutathion ou avec l'aide de la glutathion-S-transférase (Ketterer, 1988). Le glutathion seul réagit avec plusieurs ions métalliques dont le  $\text{Cd}^{2+}$  et permet la détoxification des cellules (Gregus et Klaassen, 1996). À notre connaissance, il n'existe pas d'information quant à l'implication du GSH dans la protection contre la toxicité du Cd au niveau des cellules ostéoblastiques. Ning et Grant (2000) ont cependant observé que la glutathion réductase joue un rôle important dans la régénération du GSH après réduction du chrome (Cr VI) ainsi que dans la diminution de sa toxicité pour les ostéoblastes.

#### *1.4.5- Autres mécanismes de protection*

À part les MTs, les HSP70 et le glutathion, d'autres mécanismes pouvant être plus ou moins présents dans chacune des lignées cellulaires utilisées dans ce projet pourraient faire varier la toxicité du Cd. Il s'agit de la protéine rétinoblastome (pRb), de p53 et des calbindines 28K et 9K.

La pRb fonctionne comme un coactivateur direct de transcription qui entraîne la différenciation des ostéoblastes (Thomas *et al.*, 2001). La pRb joue un rôle majeur dans le contrôle de la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire en régulant de manière répressive les facteurs de transcription E2F (Chellappan, 1991). Cette protéine agit en tant que suppresseur de tumeur et la voie de régulation du cycle

cellulaire dont elle fait partie est inactivée dans la plupart des cancers humains (Weinberg, 1995).

Quant à p53, il s'agit d'une protéine nucléaire d'un gène suppresseur de tumeur (Levine *et al.*, 1991). Elle contrôle le cycle cellulaire dans la phase G1/S (Smit *et al.*, 1996). Normalement, quand un dommage à l'ADN est détecté, p53 provoque l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Harris et Hollstein, 1993).

Finalement, les calbindines-D<sub>28K/9K</sub> («calcium binding» ou calbindine) sont des protéines de liaison qui facilitent la diffusion cytosolique du Ca<sup>2+</sup> qui entre dans la cellule (Hoenderop *et al.*, 2004). Il a été démontré que la calbindine<sub>28K</sub> possède des propriétés anti-apoptotiques attribuées à sa capacité de chélation du Ca, le Ca jouant un rôle dans les phases apoptotiques d'initiation et de dégradation (McConkey et Orrenius, 1996; Macho *et al.*, 1997).

### 1.5- MODELES CELLULAIRES UTILISES

Puisque les différents modèles ostéoblastiques humains possèdent des caractéristiques physiologiques différentes, il est intéressant de comparer nos résultats sur plus d'une lignée cellulaire. Les lignées ostéoblastiques utilisées dans ce projet (MG-63, U2OS et SaOS-2) diffèrent entre elles par leurs phénotypes, c'est-à-dire par leur niveau de maturité ostéoblastique et leur profil d'expression de la pRb, de p53 et possiblement des calbindines-D<sub>28K/9K</sub>. Les lignées MG-63 et U2OS sont des préostéoblastes (Hattar *et al.*, 2002). Elles possèdent une différenciation incomplète et donc des niveaux de phosphatase alcaline faibles. La lignée SaOS-2 est constituée d'ostéoblastes matures et possède une activité phosphatase alcaline élevée (Murray *et al.*, 1987). Rb est exprimée dans les cellules MG-63 et U2OS seulement (De Blasio *et al.*, 2005). Alors que MG-63 et SaOS-2 n'expriment pas p53, U2OS exprime p53 (Xie *et al.*, 2005; Sarimov *et al.*, 2005). La calbindine 28k est faiblement exprimée par MG-63 (Bellido *et al.*, 2000), mais son niveau d'expression reste à être déterminé

dans les deux autres lignées. Il en est de même pour la calbindine 9k qui possède un niveau d'expression inconnu pour les trois lignées utilisées.

La pRb participe au contrôle entre les phases G1 et S et favorise l'arrêt du cycle cellulaire suite à des dommages à l'ADN pouvant mener à l'apoptose (Giacinti, 2006). Le Cd provoque des dommages à l'ADN (voir revue Bertin et Averbeck, 2006). Puisqu'en absence de pRb le cycle cellulaire est à même de se poursuivre, il est possible qu'une résistance des cellules à l'apoptose induite par le Cd soit observée dans les cellules n'exprimant pas Rb.

Une relation entre l'induction de MTs par les métaux et le statut p53 a été observée pour deux types de cellules épithéliales provenant d'un cancer du sein, soit un type avec le p53 sauvage (MCF-7) et un type avec le p53 muté (MDA-MB-231). La lignée détenant le p53 muté était incapable de surexprimer les MTs ou d'initier l'apoptose après l'addition de Cd ou de Cu au milieu de culture (Fan et Cherian, 2002). Il apparaît donc que le niveau d'induction des MTs par le Cd dépendrait de l'implication de p53. En conséquence, il est fort probable que MG-63 et SaOS-2, tous deux déficients en p53, possèdent un niveau d'induction de MT nul, alors que U2OS posséderait la capacité d'induire les MTs. De plus, il a été démontré que l'ampleur de l'induction de proto-oncogènes par le Cd peut être limitée par la présence de MTs dans les cellules (Andrews *et al.*, 1987; Abshire *et al.*, 1996; Beyersmann and Hechtenberg, 1997). Ainsi, puisque les MTs modulent l'expression induite par le Cd du protooncogène *c-jun* et de p53 dans le foie de souris (Klaassen et Liu, 1998), la cytotoxicité du Cd pourrait être moins élevée dans les cellules possédant des niveaux élevés de MTs.

Nous croyons également que les niveaux de calbindines-D<sub>28K/9K</sub> exprimés par les différentes lignées pourraient faire varier la toxicité du Cd. En effet, il est possible que les calbindines-D<sub>28K/9K</sub>, en tant que protéines liant le Ca, puissent aussi lier le Cd et diminuer ainsi son effet cytotoxique. Ceci ne fera cependant pas l'objet de la présente étude.



## CHAPITRE 2

### 2.1– HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Les études mettant en relation une exposition chronique à des doses de Cd n'induisant pas de dysfonctionnement rénal, mais menant toutefois à l'apparition de pathologies osseuses, suggèrent que le Cd serait à même d'exercer un effet toxique direct sur les ostéoblastes et d'en modifier les fonctions cellulaires, ce qui contribuerait ainsi aux déséquilibres observés au niveau du métabolisme osseux (ostéoporose, ostéomalacie). Notre premier objectif est donc d'évaluer dans quelle mesure le Cd est accumulé dans les ostéoblastes.

Pour exercer sa toxicité de façon directe, le Cd se doit de pénétrer la cellule ostéoblastique. Puisque le Cd ne possède aucun rôle physiologique connu, il est permis de croire qu'il n'existe aucun mécanisme dédié à son absorption, mais qu'il emprunte plutôt des voies d'entrée destinées aux éléments essentiels. Ainsi, il est présumé que le Cd entre par les canaux calciques de type voltage-dépendants (VDCC) tel que démontré dans des études utilisant d'autres modèles cellulaires que les ostéoblastes. Nous émettons aussi l'hypothèse que le Cd emprunte les canaux calciques de type TRP qui jouent un rôle primordial dans l'homéostasie du Ca pour les ostéoblastes. Nous considérons principalement les TRPC1, 3 et 4 et les TRPM3, 6, 7 et 8 qui ont tous été identifiés comme présents dans les lignées utilisés dans ce projet.

Afin de mesurer son impact toxique, des courbes de viabilité seront obtenues en incubant les cellules à différentes concentrations de Cd. Une  $CL_{50}$  sera évaluée et permettra la comparaison entre les différentes lignées ostéoblastiques utilisées ici de même qu'avec les résultats de  $CL_{50}$  provenant de la littérature et obtenus sur d'autres types cellulaires. Des bloqueurs et activateurs de canaux seront utilisés afin de fournir des indications sur les voies de transports utilisées par le Cd pour entrer dans les ostéoblastes.

De plus, il sera important de caractériser le transport de Cd en déterminant s'il est spécifique (implication de transporteur membranaire) ou non et en caractérisant les paramètres cinétiques par l'établissement d'un  $K_m$  (constante d'affinité de Michaelis-Menten), d'un  $V_{max}$  (vitesse maximale de la capacité de transport) et d'un  $K_D$  (constante de diffusion). À nouveau, l'utilisation de bloqueurs et d'ouvriers de ces canaux nous permettra de retenir ou non certains de ces canaux comme voies possiblement impliquées dans le transport du Cd dans les cellules ostéoblastiques.

Notre deuxième objectif est de mieux comprendre comment l'ostéoblaste peut se protéger contre les effets toxiques du Cd. Certains résultats de la littérature nous suggèrent qu'il existe des mécanismes de protection intracellulaire ayant pour effet de diminuer la toxicité du Cd. Dans ce projet, l'emphasis sera portée sur les MTs en tant que protéines de protection de base mais inductibles contre la toxicité du Cd et sur les HSP70, en tant que protéines permettant la survie cellulaire, induites suite au stress causé par la présence de Cd dans les ostéoblastes. Nous émettons comme hypothèse que les lignées MG-63 et SaOS-2, toutes deux déficientes en p53, possèdent un niveau d'induction de MT nul, alors que la lignée U2OS a la capacité de surexprimer les MTs en présence de Cd.

À notre connaissance, nous sommes les premiers à étudier le transport de Cd dans les ostéoblastes. Cette étude favorisera donc une meilleure compréhension des impacts toxiques du Cd sur la physiologie osseuse et apportera des éléments d'information permettant de mieux comprendre les pathologies osseuses liées à l'absorption du Cd. Ce projet fournira également de l'information utile à des recherches ultérieures visant à améliorer les normes d'exposition au Cd pour les travailleurs industriels.

## CHAPITRE 3

### 3.1- MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 3.1.1- Culture cellulaire

Dans ce projet, les cellules MG-63, SaOS-2 et U2OS, trois lignées ostéoblastiques provenant d'ostéosarcomes humains, ont été utilisées. Ces lignées sont distribuées par l'ATCC «American Type Culture Collection». Les cellules MG-63 ont été cultivées dans du milieu complet Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F12) (Sigma) auquel ont été ajoutés 2,2g/L de bicarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ), 2 mM de L-glutamine (Invitrogen), une solution de 100U/ml de pénicilline et 100  $\mu\text{g/ml}$  de streptomycine. Le milieu a été ajusté à un pH de 7,4. Les cellules SaOS-2 et U2OS ont été cultivées dans du milieu complet McCoy's 5A (Hyclone) contenant 1,5 mM de L-glutamine, auquel ont été ajoutés 2,2g/L de bicarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ), 2 mM de L-glutamine [Invitrogen], une solution de pénicilline/streptomycine (100 U/ml), et ajusté à un pH de 7,4. À confluence, les cellules ont été dispersées avec une solution de Trypsine-EDTA (0.05%-0.02%) (Sigma), puisensemencées à 3000 cellules/ $\text{cm}^2$  pour les lignées MG-63 et U2OS, et 8000 cellules/ $\text{cm}^2$  pour la lignée SaOS-2. Après ensemencement dans leur milieu respectif additionné de 10% de sérum fœtal bovin (FBS; Cansera), les cellules ont été placées dans un incubateur à 5%  $\text{CO}_2$ , en atmosphère humide à 37°C. Le milieu de culture a été remplacé après chaque période de deux jours.

#### 3.1.2- Méthode de mesure de cytotoxicité du cadmium

L'essai MTT permet de mesurer la cytotoxicité mitochondriale du Cd et est souvent utilisé comme test de viabilité. Il mesure la réduction de sels de tétrazolium 3,[4,5-diméthylthiazol2-yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide (MTT). Le MTT est réduit en une teinture de formazan insoluble par les enzymes déshydrogénases mitochondriales associées à l'activité métabolique.



Les cellules ont été cultivées dans des plaques de 96 puits (Sarstedt) pendant 6 jours afin de leur permettre d'adhérer adéquatement (24 heures) et de retrouver leur métabolisme normal (48 à 72 heures). Les cellules retrouvent un cycle de division cellulaire et leur plein potentiel entre les jours 4 à 6, tel que démontré par l'augmentation d'expression et de sécrétion d'ostéocalcine de même que des récepteurs à la vitamine D (Lajeunesse *et al.*, 1990; 1991). Au 6<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture a été remplacé par un milieu sans sérum. L'utilisation d'un milieu sans sérum permet la synchronisation selon le cycle cellulaire. Nous avons voulu synchroniser le cycle cellulaire en prévision d'autres études qui devraient être menées spécifiquement sur des cellules en phase de prolifération. Après 24 heures de sevrage, les cellules ont été traitées à des concentrations de Cd variant de 0,5 à 100  $\mu$ M ajouté sous forme de CdCl<sub>2</sub> au milieu de culture sans sérum afin d'éviter la complexation avec l'albumine. Vingt heures après le début du traitement, le réactif MTT (0,5 mg/ml final) a été ajouté. À la fin du traitement le milieu a été retiré et le formazan a été solubilisé par l'ajout de DMSO pour environ 15 minutes à 37°C. La densité optique des puits a ensuite été lue à 575 nm. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de survie cellulaire en fonction de la concentration d'exposition (courbes dose-réponse) puis analysés par régression non linéaire selon l'équation 3.4 afin d'en extraire une valeur de CL<sub>50</sub>.

### *3.1.3- Mesure de cytotoxicité du cadmium en présence de bloqueurs et d'ouvreurs de canaux calciques*

Certains bloqueurs et ouvreurs ont été utilisés lors de la mesure MTT (3.1.2) afin de voir leur effet sur les courbes de viabilité et les valeurs de CL<sub>50</sub>. Premièrement, les cellules ont été exposées à la nifédipine et au vérapamil, deux bloqueurs de VDCC. Le Bay-K8644 a été utilisé pour ouvrir ces mêmes canaux. Le 2-APB (2-aminoethoxydiphenyl borate) et le SKF96365 ont été employés afin de bloquer les TRPC. Le capsazépine a été utilisé comme bloqueur des canaux TRPM8 alors que l'icilin a été employé comme ouvreur de ces mêmes canaux.

Ces expériences se sont déroulées en milieu de culture sans sérum. Pour tous les bloqueurs, à l'exception du SKF96365 utilisé à des concentrations de 0, 2, 5 et 10  $\mu\text{M}$ , des concentrations de 0, 20, 50 et 100  $\mu\text{M}$  ont été employées. La concentration de Cd présente a varié de 0 à 200  $\mu\text{M}$  afin d'obtenir des valeurs permettant l'atteinte d'un plateau de viabilité minimale. Les données ont été analysées par régression non linéaire selon l'équation 3.4 et les  $\text{CL}_{50}$  obtenues en présence de bloqueur ou d'ouvreur de canaux ont été comparées aux  $\text{CL}_{50}$  obtenues en présence de Cd seul. Une régression linéaire a permis d'obtenir des valeurs de pente pour la portion linéaire des courbes dose-réponse et de les comparer entre elles. Plus la pente est élevée, plus l'impact sera grand en terme de perte de viabilité pour une légère augmentation de la concentration d'exposition au Cd. Le pouvoir de cytotoxicité maximale (efficacité) du Cd a été évalué à l'aide du plateau de viabilité minimale.

#### *3.1.4- Transport de Cadmium dans les ostéoblastes*

Les cellules ont été cultivées dans des Pétris de 35 mm (Sarstedt). Au 6<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture a été remplacé par un milieu sans sérum où les cellules ont été maintenues pendant 24 heures. Après ce sevrage, les cellules ont été lavées 4 fois dans du tampon de rinçage inorganique maintenu à température pièce, ajusté à pH 7,4 et contenant 137 mM de NaCl, 5,9 mM de KCl, 1,2 mM de  $\text{MgSO}_4$ , 2,5 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM d'HEPES et 4 mM de glucose. Le rinçage avec ce tampon a permis l'élimination des ligands organiques contenus dans le milieu de culture, ayant une constante de complexation  $K_c$  inconnue, susceptibles de fixer le Cd, d'en modifier la spéciation et de diminuer le transport.

Les cellules ont ensuite été exposées soit à un milieu de transport  $\text{Cl}^-$  (même que milieu de rinçage), à un milieu de transport  $\text{NO}_3^-$  ou au milieu de culture sans sérum additionné de 0,5  $\mu\text{M}$   $^{109}\text{Cd}$  (activité spécifique variant entre 1 et 2 mCi/mg). Le milieu de transport  $\text{NO}_3^-$ , contenant 137 mM de  $\text{NaNO}_3$ , 5,9 mM de  $\text{KNO}_3$ , 1,2 mM de  $\text{MgSO}_4$ , 2,5 mM de  $\text{CaNO}_3$ , 10 mM de HEPES et 4 mM de glucose, a été également maintenu à température pièce et ajusté à pH 7,4. Cette solution a été

préparée d'avance et laissée à température pièce toute la nuit pour permettre l'atteinte d'un équilibre thermodynamique chimique de complexation du Cd. De plus, afin d'évaluer une inhibition possible entre le Cd et le Ca, un transport de 3 minutes a été effectué avec les milieux  $\text{Cl}^-$  et  $\text{NO}_3^-$ , contenant ou non du Ca, dans le dernier cas le Ca a été remplacé par du Na en prenant soin de garder l'osmolarité constante. En milieu de transport  $\text{Cl}^-$  et en milieu de culture sans sérum, le temps d'exposition a varié de 1 minute à 24 heures afin de déterminer la cinétique de transport du Cd. Afin de distinguer le transport spécifique du non spécifique et de déterminer les paramètres  $V_{\text{max}}$  et  $K_m$ , une exposition au milieu de transport additionné de  $0,5 \mu\text{M}$   $^{109}\text{Cd}$  a été faite à temps fixe (3 minutes) en faisant varier la concentration de Cd froid (0 à 100 mM) ajouté sous forme de  $\text{CdCl}_2$ . Les résultats obtenus ont été analysés à l'aide de l'équation 3.2.

Chaque expérience de transport a été arrêtée par 4 rinçages dans une solution d'arrêt maintenue à  $4^\circ\text{C}$ , soit le milieu de rinçage initial contenant 4 mM d'EDTA (sel disodique de l'acide éthylènediamine tétraacétique) qui a permis la chélation et le retrait du Cd adsorbé à la surface cellulaire externe. Le temps court de la procédure d'arrêt et la mise à sec des cellules ne permettent pas d'efflux du Cd cellulaire. L'ajout de NaOH 1 M a permis la solubilisation des cellules. De cette solution, 300  $\mu\text{l}$  ont été utilisés afin d'en déterminer le contenu en radioactivité ( $^{109}\text{Cd}$ ) au compteur gamma (Cobra II; Camberra Packard Canada). Puis, 50  $\mu\text{l}$  ont été utilisés pour effectuer un dosage protéique par la méthode de Bradford (1976), à l'aide d'un spectrophotomètre Tecan SpectraFluor Plus (Esbe Scientific Industries Inc., Canada), en utilisant le BSA (Bovine Serum albumine) comme standard pour la courbe de calibration. Les résultats d'accumulation cellulaire sont exprimés en  $\text{pmol } ^{109}\text{Cd}/\text{mg}$  protéine.



### *3.1.5- Utilisation de bloqueurs et d'ouvreurs de canaux afin de déterminer les voies d'entrée du cadmium*

Pour l'utilisation de bloqueurs ou d'ouvreurs de canaux, les méthodes ont été les mêmes que pour le transport de Cd, à quelques exceptions près. D'abord, après le sevrage de 24 heures et le rinçage, les cellules ont été préincubées pendant 15 minutes avec le bloqueur ou l'ouvreur choisi. Le temps d'exposition au Cd a été fixé à 3 minutes. Le transport de Cd avec un bloqueur ou un ouvreur a été comparé à la condition contrôle. Toutes ces expériences ont été faites en absence de Ca, afin d'exclure la possibilité d'une inhibition du transport de Cd par le Ca.

Puisque les VDCC ne sont majoritairement ouverts qu'en condition de dépolarisation membranaire, le transport a préalablement été effectué en milieu  $\text{Cl}^-$  et  $\text{NO}_3^-$  à une concentration de 100 mM de K, en faisant diminuer la concentration de Na afin de garder la même osmolarité. Pour bloquer les VDCC, le vérapamil et la nifédipine ont été ensuite utilisés à 50  $\mu\text{M}$  (tel qu'habituellement employés) en condition dépolarisante. En condition basale, il est fort probable que les canaux TRPC soient fermés, car, selon le modèle «store-operated channels» (SOC), ces canaux s'ouvrent suite à un relargage de Ca du réticulum endoplasmique (RE). Ainsi, l'utilisation de thapsigargine (TP) (0,1  $\mu\text{M}$ ; préincubation de 3 minutes seulement), en tant qu'inducteur d'entrée de Ca capacitatif (CCE), permettra la vidange du RE (en inhibant les pompes calciques) puis l'ouverture des TRPC. Les canaux TRPC ont été bloqués par l'utilisation de SKF96365 (5  $\mu\text{M}$ ).

### *3.1.6- Étude de l'expression des métallothionéines dans les différentes lignées*

Les lignées cellulaires ont été cultivées dans des Pétris de 60 mm (Sarstedt). Au 6<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture a été remplacé par un milieu sans sérum où les cellules ont été maintenues pendant 24 heures. Ce milieu de sevrage a été remplacé par un milieu similaire additionné de 10  $\mu\text{M}$  Cd, concentration suffisante, prédéterminée par les essais MTT, pour voir apparaître un très faible pourcentage de

mort cellulaire en fonction d'un temps d'exposition variant entre 6h et 24h. En ajoutant du Cd (sous forme de  $\text{CdCl}_2$ ) nous voulions déterminer un temps optimal d'induction des MTs (entre 6h et 24h). Un pétri témoin a été maintenu dans les mêmes conditions en absence de Cd. Après le traitement, l'ARN total a été isolé par l'ajout de TRIZOL® Reagent (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. L'ARN obtenu après séchage a été dissous dans de l'eau traitée au Diethyl pyrocarbonate (DEPC) et sa quantification a été effectuée par lecture des absorbances ( $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$ ) au spectrophotomètre. Les niveaux d'ARNm des MT1/2 ont été évalués par «Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction» (RT-PCR). L'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) a été synthétisé grâce à la transcriptase inverse (RT) en employant le kit Omniscript™ RT (Qiagen) selon le protocole fourni. Les amorces MT1/2 utilisées ont été les suivantes : sens, 5'-TGGACCCCAACTGCTCCTGC-3'; antisens, 5'-GCCCTGGGCACACTTGGCAC-3'. Les produits de PCR pour MT1/2 ont été obtenus après 40 cycles. L'ARNm du gène de maintien glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase (GAPDH) a été amplifié pendant 30 cycles, en utilisant ces amorces : sens, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'; antisens, 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'. Le niveau d'expression a été évalué en effectuant une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) conventionnelle à l'aide du kit Taq PCR Core (Qiagen) en suivant le protocole fourni. La détermination du niveau d'expression de GAPDH permet la comparaison avec les niveaux relatifs de l'ARNm de l'ensemble des isoformes de MTs. Le programme d'amplification a été le suivant : trois minutes à 94°C pour la dénaturation initiale, suivi de 40 cycles (pour MT1/2) ou 30 cycles (pour GAPDH) comprenant chacun une dénaturation de 30 secondes à 94°C, une hybridation de 30 secondes à 58°C et 1 minute d'élongation à 72°C. Ces cycles ont été suivis d'une élongation finale de 7 minutes à 72°C. Un volume de 5 µl de la réaction de PCR a été analysé sur un gel d'agarose 2% avec un standard de 100 pb (Amersham Biosciences). L'ADN a été ensuite visualisé à l'aide de bromure d'éthidium (EtBr).

sous UV. La taille attendue des amplicons était de 140 pb. Une analyse semi-quantitative a été effectuée par densitométrie et les résultats ont été présentés sous forme de ratio en fonction de l'expression de GAPDH.

#### *3.1.7- Étude de l'expression de HSP70 dans les différentes lignées*

Les étapes suivies sont les mêmes que pour l'induction de l'expression des MT (point 4.5). Les amorces PCR utilisées pour amplifier l'ARNm de HSP70 ont été les suivantes : sens, 5'-GGCATCGACCTGGGCACCAC-3' ; antisens, 5'-TCCTTGGTGGCCTGGCGCTG-3'. Les produits de PCR ont été obtenus après 40 cycles et analysés comme décrits précédemment. La taille attendue des amplicons était de 458 pb.

#### *3.1.8- Analyse des résultats*

Chacune des expériences a été reconduite de façon indépendante au minimum trois fois. Afin d'estimer les paramètres cinétiques et de toxicité le logiciel GraphPad PRISM version 4.00 (GraphPad Software, San Diego, California USA) a été utilisé. Les résultats ont été analysés par un test de T lorsque seulement deux groupes de données étaient présents. Le test de Dunnett à comparaisons multiples a servi lorsque deux groupes de données ou plus devaient être comparés à un groupe contrôle. Finalement, le test de Tukey à comparaisons multiples a permis la comparaison de plus de deux groupes de données entre eux, lorsqu'il n'y avait pas de groupe contrôle. Le seuil de significativité a été fixé à  $p < 0,05$ .

##### *3.1.8.1- Accumulation à temps fixe, en conditions de vitesse initiale*

L'influx de  $^{109}\text{Cd}$  possède deux composantes. La première (A) est spécifique et saturable, et la seconde (B) est non spécifique (diffusion passive). Ainsi, le transport peut être traduit par l'équation 3.1 :

(3.1)

$$v_i = \frac{V_{\max} [^{109}\text{Cd}]}{K_m + [^{109}\text{Cd}]} + k_D [^{109}\text{Cd}]$$

---

A

---

B

où :

$v_i$	= vitesse initiale
$V_{\max}$	= vitesse maximale
$K_m$	= constante d'affinité
$k_D$	= constante de diffusion

Le transport de  $^{109}\text{Cd}$  est évalué en terme de composantes spécifique et non-spécifique. Le Cd non marqué (froid) est utilisé comme inhibiteur compétitif. Ainsi, le  $K_i$  d'inhibition correspond au  $K_m$  pour le transport ce qui permet de simplifier l'équation d'inhibition 3.2. De plus, la concentration de Cd froid (100  $\mu\text{M}$ ) est beaucoup plus élevée (200 fois), que celle de  $^{109}\text{Cd}$  (0,5  $\mu\text{M}$ ) et saturable par rapport au  $K_m$ , ce qui inhibe la quasi-totalité de la composante spécifique de l'influx de traceur  $^{109}\text{Cd}$ . Le transport de  $^{109}\text{Cd}$  en présence de Cd peut être traduit par l'équation 3.2 :

(3.2)

$$v_i = \frac{V_{\max} [^{109}\text{Cd}]}{K_m \left[ 1 + \frac{[I]}{K_i} \right] + [^{109}\text{Cd}]} + k_D [^{109}\text{Cd}] \Rightarrow v_i = \frac{V_{\max} [^{109}\text{Cd}]}{K_m + [I] + [^{109}\text{Cd}]} + k_D [^{109}\text{Cd}]$$

où :

$I$	= concentration de l'inhibiteur Cd
$K_i$	= constante d'inhibition

3.1.8.2- Accumulation en fonction du temps



L'accumulation de Cd en fonction du temps est calculée à l'aide de la mono-exponentielle croissante suivante (**équation 3.3**) :

(3.3)

$$A = A_0 + A_{\max} (1 - e^{-kt})$$

où :

- A = accumulation (pmol/mg de protéines)
- A<sub>max</sub> = accumulation à l'équilibre
- A<sub>0</sub> = accumulation à temps = 0
- k = constante de temps du processus d'accumulation (ex : 1/min ou 1/heure)

#### 3.1.8.3- Analyse de la cytotoxicité du cadmium

Les données obtenues à l'aide de l'essai MTT sont analysées par régression non linéaire et des valeurs de CL<sub>50</sub> (représentatives du potentiel toxique) en sont tirées à l'aide de l'**équation 3.4** :

(3.4)

$$Y = Y_{\min} + \frac{Y_{\max} - Y_{\min}}{1 + 10^{((\log CL_{50} - x) \cdot Hill)}}$$

où :

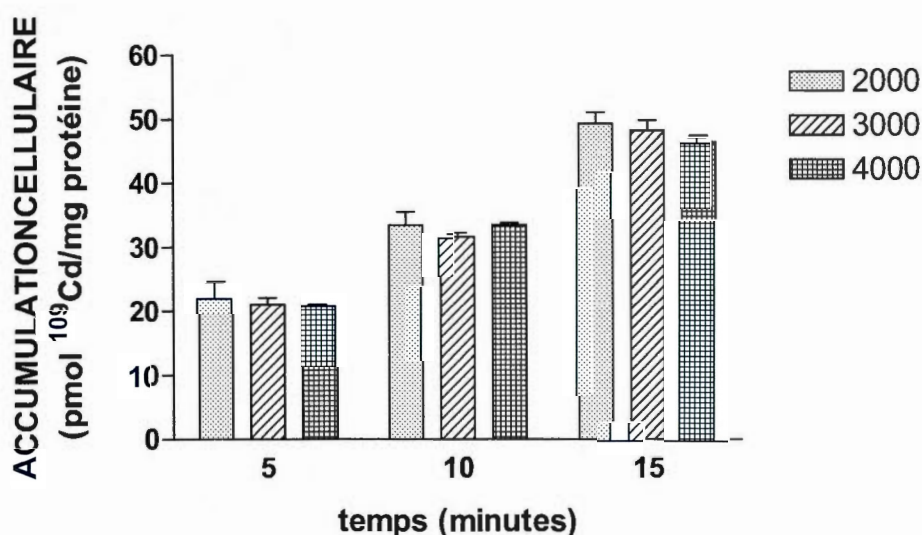
- Y<sub>min</sub> = Valeur du plateau inférieur (% de viabilité maximale)
- Y<sub>max</sub> = Valeur du plateau supérieur (viabilité maximale, soit 100%)

L'erreur sur l'estimé des paramètres est l'erreur associée aux régressions.

#### 3.1.9- Transport de cadmium en fonction du niveau de confluence



À notre laboratoire, la quantité d'ensemencement standard des cellules MG-63 est de 3000 cellules/cm<sup>2</sup> ce qui nous permet d'obtenir une confluence variant entre 80 et 90% après 6 jours. Afin de déterminer si le transport diffère selon le pourcentage de confluence cellulaire, des Pétris ont été ensemencés à 2000, 3000 et 4000 cellules/cm<sup>2</sup>. Au 7<sup>ème</sup> jour (suite à un sevrage de 24h), leur pourcentage de confluence respectif était de 65, 80 et 95%. Voici les résultats d'accumulation de <sup>109</sup>Cd obtenus :



**Figure 3.1 : Accumulation de 0,5  $\mu$ M <sup>109</sup>Cd en tampon chlorure pour la lignée MG-63.** Les cellules ont été cultivées dans des Pétris de 35 mm pendant 6 jours. Au 6<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture a été remplacé par un milieu équivalent sans sérum pour un sevrage de 24h. Les cellules ont ensuite été exposées à un milieu chlorure en présence de 0,5  $\mu$ M <sup>109</sup>Cd pendant 3 minutes. Aucune différence significative comparativement à la condition standard de 3000 cellules/cm<sup>2</sup> selon le test de Dunnett à comparaison multiple ( $p > 0,05$ ).

Ces résultats (figure 3.1) nous montrent que la différence de confluence n'affecte pas le transport. Ainsi, les différences d'accumulation qui seront observées à la section Résultats ne sont pas attribuables aux confluences possiblement différentes d'un Pétris à l'autre, ou d'un passage à l'autre.

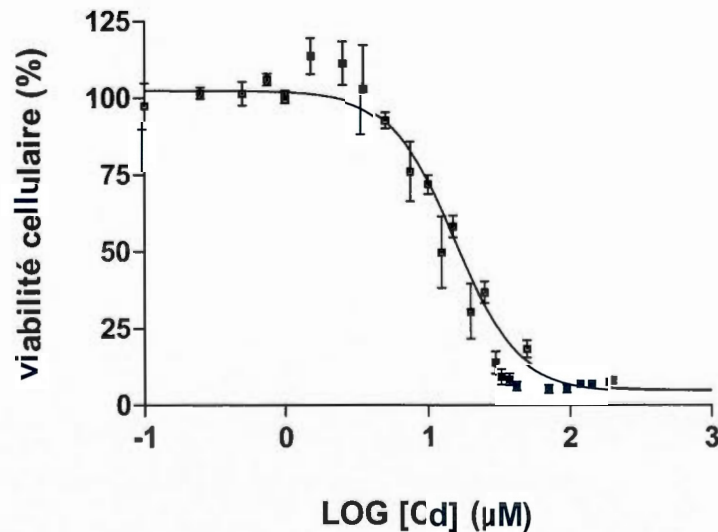
## CHAPITRE 4

### 4.1- RÉSULTATS

#### 4.1.1- Cytotoxicité du cadmium pour la lignée MG-63

##### 4.1.1.1- Viabilité cellulaire en fonction de l'augmentation de la concentration de cadmium

Nous avons d'abord fait ressortir le caractère cytotoxique du Cd pour la lignée MG-63 dans un milieu de culture sans sérum. La variation de la viabilité cellulaire en fonction de la concentration d'exposition au Cd répond à une courbe dose-réponse classique de type sigmoïdale lorsqu'exprimée sur un graphique semi-logarithmique. Ce type de dose-réponse réfère à une courbe typique d'un élément toxique. En effet, la figure 4.1 indique qu'une augmentation de la concentration de Cd dans le milieu de culture réduit graduellement la viabilité des cellules MG-63. L'analyse de la courbe de viabilité a permis d'obtenir une valeur de  $CL_{50}$  de  $15,5 \pm 1,1 \mu M$ .



**Figure 4.1 : Viabilité cellulaire mesurée à l'aide de l'essai MTT pour la lignée MG-63.** Les cellules ont été cultivées dans des plaques de 96 puits pendant 6 jours. Au 6<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture a été remplacé par un milieu équivalent

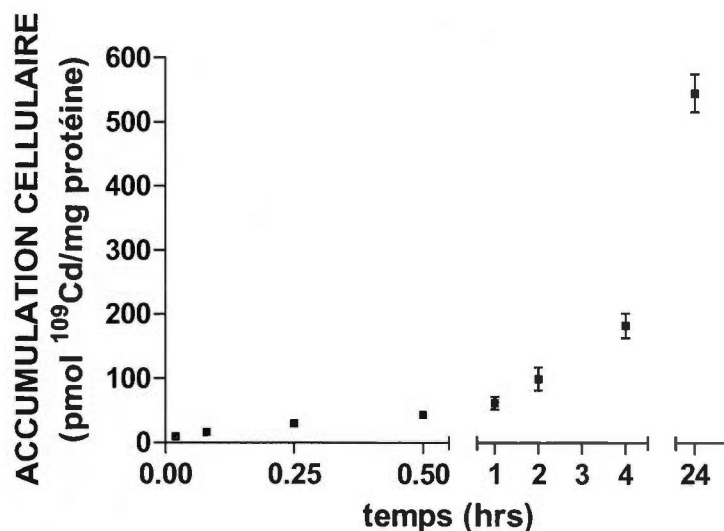
sans sérum pour un sevrage de 24h. Les cellules ont ensuite été traitées pendant 24h à des concentrations de Cd variant de 0,5 à 200  $\mu\text{M}$  ajoutées au milieu de culture sans sérum et la viabilité cellulaire a été évaluée par un essai MTT tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. Les données sont exprimées en pourcentage de viabilité cellulaire en fonction du contrôle (0  $\mu\text{M}$  Cd, milieu sans sérum). Les résultats sont les moyennes  $\pm$  écart-types obtenus d'au moins trois expériences indépendantes.

#### *4.1.2- Transport de cadmium dans la lignée MG-63*

La cytotoxicité observée à la figure 4.1 suggère que le Cd entre dans les cellules ostéoblastiques. Nous avons donc par la suite caractérisé l'accumulation de Cd par les cellules ostéoblastiques.

##### *4.1.2.1- Accumulation cellulaire de $^{109}\text{Cd}$ en fonction du temps*

En premier lieu, nous avons mesuré l'accumulation cellulaire de 0,5  $\mu\text{M}$   $^{109}\text{Cd}$  pour la même lignée dans le milieu de culture sans sérum en fonction du temps. Tel que présenté à la figure 4.1, une concentration de 0,5  $\mu\text{M}$  de Cd dans le milieu d'exposition ne produit pas de mortalité sur une période de 24 heures. La figure 4.2 montre que le Cd est accumulé dans la lignée MG-63 et que cette accumulation augmente en fonction du temps.



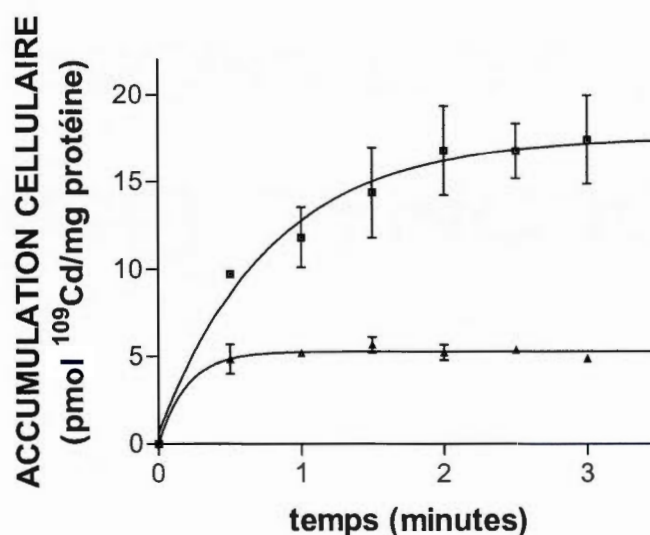
**Figure 4.2 : Accumulation cellulaire de  $^{109}\text{Cd}$  en fonction du temps dans la lignée MG-63.** Les cellules ont été cultivées dans des Pétris de 35 mm pendant 6 jours. Au 6<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture a été remplacé par un milieu équivalent sans sérum pour un sevrage de 24h. Les cellules ont été exposées à  $0,5 \mu\text{M}$   $^{109}\text{Cd}$  en milieu chlorure pour les durées suivantes : 1, 5, 15, 30 minutes et 1, 2, 4 et 24 heures. Les résultats sont les moyennes  $\pm$  écart-types obtenus de trois expériences indépendantes.

#### 4.1.2.2- Analyse de la cinétique de l'accumulation cellulaire de $^{109}\text{Cd}$

Le transport de  $^{109}\text{Cd}$  est mesuré en milieu chlorure, sur 3 minutes, en absence et en présence de  $100 \mu\text{M}$  de Cd non radioactif. Le Cd non radioactif est utilisé comme inhibiteur compétitif. La présence de Cd non radioactif à une concentration 200 fois plus élevée que celle du  $^{109}\text{Cd}$  nous place en condition saturante et permet de discriminer le transport non spécifique du transport spécifique. Les résultats ont été analysés par régression non-linéaire en accord avec l'équation 3.3. Les valeurs de  $A_{\text{max}}$  (accumulation à l'équilibre) obtenues en absence et en présence de  $100 \mu\text{M}$  Cd non radioactif sont respectivement de  $17 \pm 0,8$  et  $5,3 \pm 0,3$  pmol  $^{109}\text{Cd}$ /mg protéine. La plus faible valeur d'accumulation révèle non seulement une inhibition du transport



de  $^{109}\text{Cd}$  par le Cd non radioactif, mais suggère aussi une compétition pour des sites de liaison intracellulaire, à moins qu'un système de transport concentratif soit impliqué. Ainsi, la différence de 11,7 pmol  $^{109}\text{Cd}/\text{mg}$  protéine représente l'accumulation spécifique.

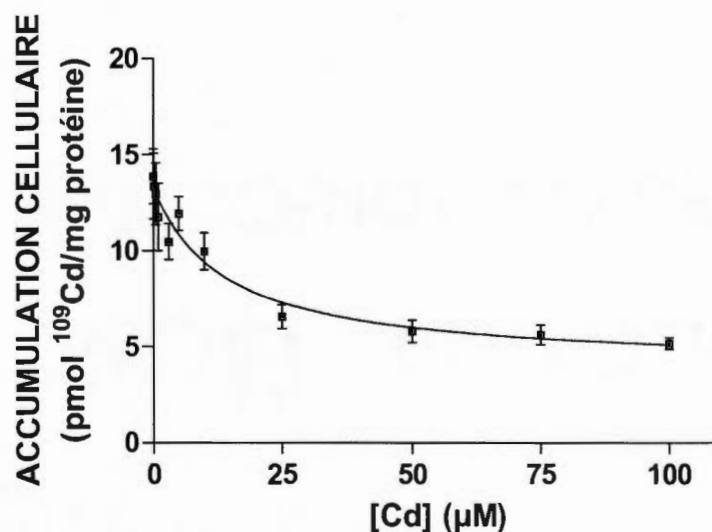


**Figure 4.3 : Accumulation initiale (3 minutes) de  $0,5 \mu\text{M}$   $^{109}\text{Cd}$  en absence et en présence de  $100 \mu\text{M}$  de Cd non radioactif dans la lignée MG-63.** Les cellules ont été cultivées dans des Pétris de 35 mm pendant 6 jours. Au 6<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture a été remplacé par un milieu équivalent sans sérum pour un sevrage de 24h. Les cellules ont ensuite été exposées à  $0,5 \mu\text{M}$   $^{109}\text{Cd}$  en milieu chlorure seul (carrés) et en présence de  $100 \mu\text{M}$  de Cd non radioactif (triangles) pendant 3 minutes. Les résultats sont les moyennes  $\pm$  écart-types obtenus de deux expériences indépendantes.

Puisqu'une composante spécifique est présente dans le transport de Cd dans les cellules MG-63, nous avons déterminé les paramètres cinétiques de l'accumulation toujours en milieu chlorure, en présence de  $0,5 \mu\text{M}$   $^{109}\text{Cd}$  et de Cd non radioactif à des concentrations variant entre 0 et  $100 \mu\text{M}$ . Nos résultats de la

figure 4.4 montrent que l'accumulation de  $^{109}\text{Cd}$  dans les cellules MG-63 diminue en fonction de l'augmentation de la concentration de Cd non radioactif, utilisé ici comme inhibiteur compétitif. Une analyse de régression non linéaire des données (équation 3.2) a permis d'obtenir les valeurs présentées au tableau 4.1. Puisqu'il n'est pas possible de discriminer différentes valeurs de  $K_m$ , les résultats sont en accord avec un modèle à un seul système de transport. La possibilité que deux systèmes de  $K_m$  très similaires soient parallèlement impliqués ne peut toutefois être écartée. Cette valeur de  $K_m$  correspond à la concentration de Cd non radioactif qui inhibe la moitié du transport spécifique de  $^{109}\text{Cd}$ . La présence d'une valeur de  $k_D$  nous indique qu'une partie du transport de  $^{109}\text{Cd}$  se fait de façon non-spécifique, soit par diffusion passive. Le transport spécifique correspond au transport qu'il est possible d'inhiber puisque ce sont des protéines membranaires qui en sont responsables.

En milieu chlorure, la spéciation du Cd est connue. Le Cd s'y trouve principalement (à 84%) sous forme de chlorocomplexes ( $\text{CdCl}_n^{2-n}$ ). L'utilisation du milieu chlorure pour le transport permet de comparer nos résultats de  $K_m$  et  $V_{\max}$  (tableau 4.1) avec les résultats d'autres études réalisées dans le même milieu par Elisma et Jumarie (2001) et Bergeron et Jumarie (2006).



**Figure 4.4 :** Accumulation initiale (3 minutes) de  $0,5 \mu\text{M}$   $^{109}\text{Cd}$  en présence de concentrations de Cd non radioactif variant de 0 à  $100 \mu\text{M}$  dans la lignée MG-63. Les cellules ont été cultivées dans des Pétris de 35 mm pendant 6 jours. Au 6<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture a été remplacé par un milieu équivalent sans sérum pour un sevrage de 24h. Les cellules ont ensuite été exposées à un milieu chlorure additionné de  $0,5 \mu\text{M}$   $^{109}\text{Cd}$  et de concentrations de Cd non radioactif variant entre 0 et  $100 \mu\text{M}$  pendant 3 minutes. Le graphique représente les moyennes  $\pm$  écart-types de trois expériences indépendantes.

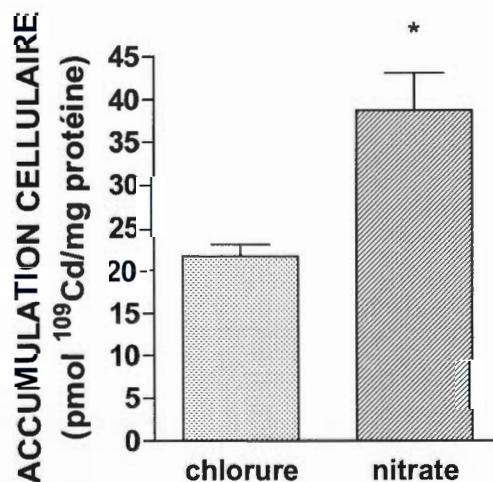
**Tableau 4.1 :** Paramètres cinétiques de l'accumulation initiale (3 minutes) de  $^{109}\text{Cd}$

$V_{\max}$ (pmol/3 min/mg protéine)	$K_m$ (μM)	$k_D$ (pmol/3 min/mg protéine/μM)
$261 \pm 59$	$13,5 \pm 2,7$	$7,9 \pm 0,9$

Les paramètres  $V_{\max}$  et  $K_m$  ont leur signification habituelle alors que la valeur de  $k_D$ , la constante de diffusion, représente la portion non-spécifique qui contribue à l'accumulation. Les valeurs présentées  $\pm$  écart-type ont été obtenues à l'aide de l'équation 3.1.

#### 4.1.2.3- Accumulation cellulaire de $^{109}\text{Cd}$ en fonction de la spéciation inorganique

Le  $\text{Cl}^-$ , en tant que ligand inorganique, possède une très grande affinité pour le  $\text{Cd}^{2+}$  ( $\log K_c \text{ CdCl}^+ = 1,98$ ). Ainsi, 80% de la totalité du métal dissous est présent sous forme  $\text{CdCl}_n^{2-n}$  (n variant de 1 à 3) en milieu chlorure. Cependant, le  $\text{NO}_3^-$  n'a pas autant d'affinité pour le  $\text{Cd}^{2+}$  ( $\log K_c \text{ CdNO}_3^+ = 0,5$ ). En remplaçant le  $\text{Cl}^-$  par du  $\text{NO}_3^-$  dans le milieu de transport, la portion de Cd sous forme ionique ( $\text{Cd}^{2+}$ ) passe de 14% à 80% de la totalité du métal dissous, soit une augmentation de 571%. Nous avons utilisé les milieux de transport chlorure et nitrate afin d'évaluer si l'accumulation du  $^{109}\text{Cd}$  dans les cellules MG-63 varie selon la spéciation inorganique du Cd. La figure 4.5 montre une plus grande accumulation de  $^{109}\text{Cd}$  en milieu nitrate, avec une augmentation significative de 79% par rapport au milieu chlorure ( $22 \pm 3$  vs.  $38 \pm 10$  pmol/3 min/mg protéine).



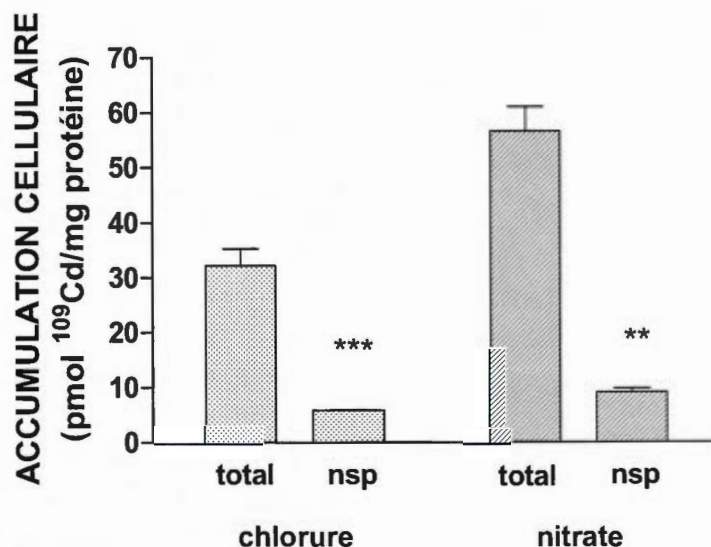
**Figure 4.5 :** Accumulation initiale (3 minutes) de  $0,5 \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$  en milieu chlorure et nitrate dans la lignée MG-63. Les cellules ont été cultivées dans des Pétris de 35 mm pendant 6 jours. Au 6<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture a été remplacé par un milieu équivalent sans sérum pour un sevrage de 24h. Les cellules ont été



exposées à  $0,5 \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$  en milieu chlorure et nitrate pendant 3 minutes. Les barres représentent les moyennes  $\pm$  écart-types de cinq expériences indépendantes.  
 \* significativement différent comparativement à la condition en milieu chlorure selon le test T de Student ( $p < 0,05$ ).

#### *4.1.2.4- Composantes spécifique et non-spécifique selon le milieu de transport*

Nous avons ensuite voulu évaluer la part d'accumulation provenant du transport spécifique en milieu nitrate et chlorure en utilisant un excès de Cd non radioactif. Les résultats obtenus en absence de Ca, présentés à la figure 4.6, montrent que le transport non spécifique est un peu plus élevé en milieu nitrate qu'en chlorure ( $9.1 \pm 1.0$  vs.  $5.9 \pm 0.1$  pmol/3 min/mg protéine) mais dans les deux conditions la contribution au transport total est similaire (respectivement 16% et 18%). Ainsi, en prenant en compte l'accumulation totale, une augmentation de 76 % est observée en milieu nitrate, alors qu'une augmentation de 81% est observée pour l'accumulation spécifique exclusivement. Il est intéressant de mentionner qu'en modifiant le chlorure par le nitrate, la concentrations de Cd présent sous forme de  $\text{Cd}^{2+}$  augmente de 0,07 à  $0,4 \mu\text{M}$  (respectivement 14% et 80% du Cd total dissous) ce qui représente plus de 500% d'augmentation. Il est donc clair que l'augmentation du transport spécifique en milieu nitrate est beaucoup plus faible que l'augmentation des niveaux de  $[\text{Cd}^{2+}]$  (aucune corrélation directe entre augmentation de l'accumulation et celle de  $[\text{Cd}^{2+}]$ ) ce qui suggère que le  $\text{Cd}^{2+}$  n'est pas la seule forme impliquée dans l'accumulation de Cd, à moins que l'affinité du transport pour le  $\text{Cd}^{2+}$  soit si élevée qu'un processus de saturation soit établi.

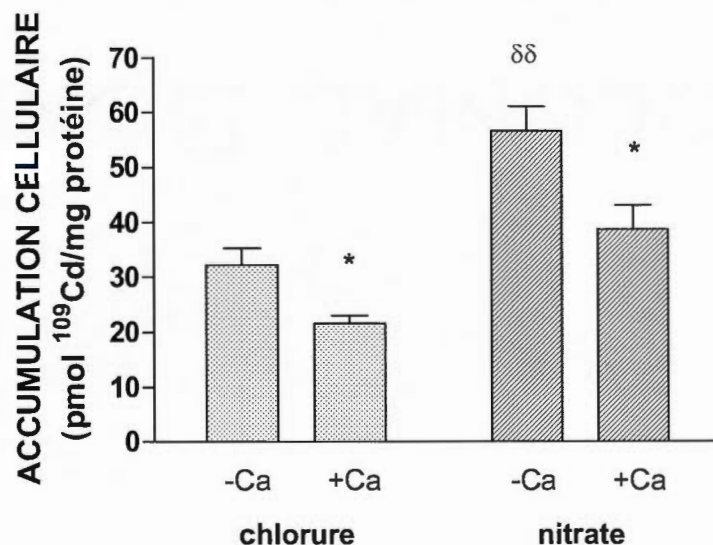


**Figure 4.6 :** Accumulation initiale (3 minutes) de  $0,5 \mu\text{M}$   $^{109}\text{Cd}$  en milieu chlorure et nitrate en absence ou en présence de  $100 \mu\text{M}$  de Cd non radioactif dans la lignée MG-63. Les cellules ont été cultivées dans des Pétris de 35 mm pendant 6 jours. Au 6<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture a été remplacé par un milieu équivalent sans sérum pour un sevrage de 24h. Les cellules ont été exposées à  $0,5 \mu\text{M}$   $^{109}\text{Cd}$  en milieu chlorure ou en milieu nitrate sans Ca en présence (nsp = non spécifique) ou en absence (total) de  $100 \mu\text{M}$  de Cd non radioactif pendant 3 minutes. Les barres représentent les moyennes  $\pm$  écart-types obtenus d'entre deux et cinq expériences indépendantes. \*\* et \*\*\* significativement différent comparativement à la condition contrôle pour chacun des milieux selon le test T de Student (\*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ ).

#### 4.1.2.5- Accumulation cellulaire de $^{109}\text{Cd}$ et interaction avec le calcium

Nous avons vérifié s'il y avait présence d'inhibition entre le Cd et le Ca pour les voies d'entrée dans la cellule. Selon nos résultats présentés à la figure 4.7, la présence de  $2,5 \text{ mM}$  Ca entraîne, dans les deux milieux de transport, une diminution semblable de l'accumulation de  $^{109}\text{Cd}$ , soit respectivement 33% et 32%. Ces résultats suggèrent que des canaux ioniques transportant le calcium pourraient être potentiellement responsables du transport de Cd. De plus, les résultats montrent une plus grande accumulation de  $^{109}\text{Cd}$  en milieu nitrate qu'en milieu chlorure en absence

de Ca ( $32 \pm 7$  vs.  $57 \pm 9$  pmol/3 min/mg protéine), avec une augmentation significative de 76%, augmentation semblable à celle observée en présence de Ca.

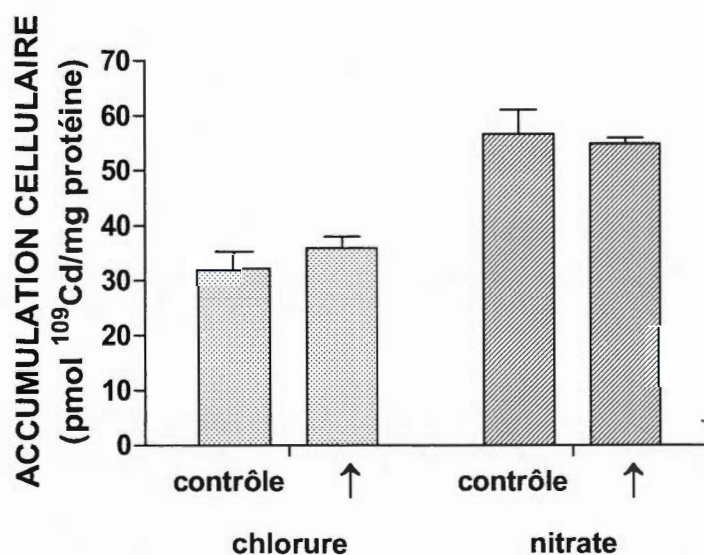


**Figure 4.7 : Accumulation initiale (3 minutes) de  $0,5 \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$  en milieu chlorure et nitrate en absence ou en présence de  $2,5 \text{ mM Ca}$  dans la lignée MG-63.** Les cellules ont été cultivées dans des Pétris de 35 mm pendant 6 jours. Au 6<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture a été remplacé par un milieu équivalent sans sérum pour un sevrage de 24h. Les cellules ont été exposées à  $0,5 \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$  en milieu chlorure ou nitrate avec ou sans Ca pendant 3 minutes. Les barres représentent les moyennes  $\pm$  écart-types obtenus de cinq expériences indépendantes. \* significativement différent comparativement à la condition sans Ca pour chacun des milieux; δδ significativement différent comparativement à la condition contrôle en absence de Ca en chlorure selon le test T de Student (\*  $p < 0,05$ ; δδ  $p < 0,01$ ).

#### *4.1.2.6- Accumulation cellulaire de $^{109}\text{Cd}$ et canaux calciques voltage-dépendants*

Puisque la présence de Ca diminue le transport de Cd, nous nous sommes intéressés aux canaux calciques exprimés par les ostéoblastes MG-63. Notre intérêt a d'abord pointé vers les VDCC. L'augmentation de la concentration en K du milieu de transport de 5,9 mM à 100 mM entraîne la dépolarisation membranaire des cellules et l'ouverture de ces canaux. Les VDCC sont normalement fermés en condition basale. Nous avons utilisé les milieux chlorure et nitrate en absence de Ca, en condition basale et en condition de dépolarisation membranaire afin d'évaluer si l'ouverture des VDCC a un impact sur l'accumulation de Cd. L'absence de Ca dans le milieu de transport permet d'observer l'effet de dépolarisation en absence d'inhibition par le Ca. De plus, le passage du milieu chlorure au milieu nitrate favorise la présence de Cd sous forme  $\text{Cd}^{2+}$ . C'est cette forme qui pourrait être transportée puisque les VDCC sont des canaux cationiques qui transportent le Ca sous forme  $\text{Ca}^{2+}$ . Tel que présenté à la figure 4.8 et au tableau 4.2, nos résultats indiquent que l'augmentation de la concentration en K à 100 mM entraîne, en milieu chlorure, une augmentation non significative de 12% de l'accumulation totale de  $^{109}\text{Cd}$  et en milieu nitrate, une diminution non significative de 3%. Les résultats ne varient que très peu lorsque seule l'accumulation spécifique est prise en compte. Ces résultats suggèrent que les VDCC ne constituent pas une voie majeure d'entrée du Cd dans les cellules MG-63.



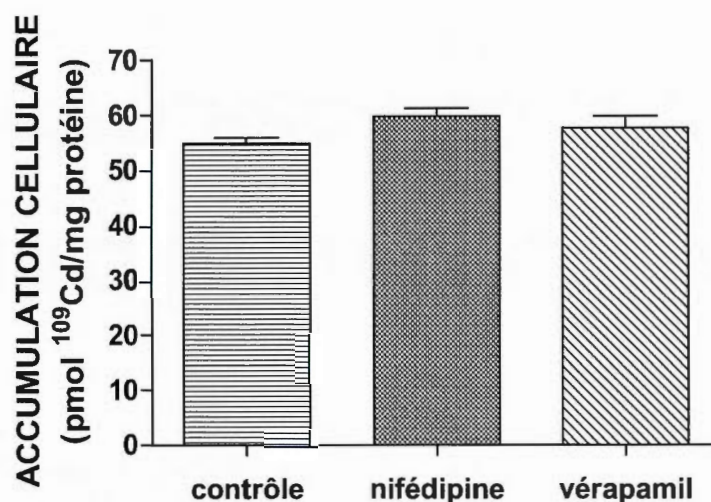


**Figure 4.8 : Accumulation initiale (3 minutes) de  $0,5 \mu\text{M}$   $^{109}\text{Cd}$  en milieu chlorure et nitrate en absence de Ca et en concentration de  $\text{K}^+$  standard ou élevée dans la lignée MG-63.** Les cellules ont été cultivées dans des Pétris de 35 mm pendant 6 jours. Au 6<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture a été remplacé par un milieu équivalent sans sérum pour un sevrage de 24h. Les cellules ont ensuite été exposées à  $0,5 \mu\text{M}$   $^{109}\text{Cd}$  en milieu chlorure ou nitrate sans Ca et en concentration de  $\text{K}^+$  standard ( $5,9\text{mM}$ ; contrôle) ou élevée ( $100\text{mM}$ ; ↑) pendant 3 minutes. Les barres représentent les moyennes  $\pm$  écart-types d'au moins trois expériences indépendantes. Aucune différence significative comparativement à la condition standard sans Ca pour chacun des milieux selon le test T de Student.

**Tableau 4.2 :** Accumulation cellulaire (3 min) totale et spécifique de 0.5  $\mu\text{M}$  de  $^{109}\text{Cd}$  en milieu chlorure et nitrate en absence de Ca et en concentration de  $\text{K}^+$  standard (contrôle) ou élevée. La variation correspond à la différence d'accumulation relative à la valeur contrôle.

Milieu	Accumulation totale (pmol /mg protéine)	Variation (% total)	Accumulation spécifique (pmol /mg protéine)	Variation (% spécifique)
<i>Chlorure</i>				
Contrôle	32,2 $\pm$ 6,9		26,3	
[K+] élevée	35,9 $\pm$ 3,0	+ 12%	30,0	+ 14%
<i>Nitrate</i>				
Contrôle	56,6 $\pm$ 8,8		47,5	
[K+] élevée	54,9 $\pm$ 1,5	- 3%	45,8	- 4%

Afin de s'assurer du peu d'implication des VDCC dans l'entrée de Cd, nous avons utilisé la nifédipine et le vérapamil, deux bloqueurs de VDCC, en milieu nitrate, en absence de Ca et en condition de dépolarisation membranaire. Les résultats de la figure 4.9 et du tableau 4.3 montrent que la présence de ces bloqueurs ne change pas significativement les valeurs d'accumulation cellulaire. Ces résultats confirment l'absence d'implication des VDCC en tant que voie majeure d'entrée de Cd.



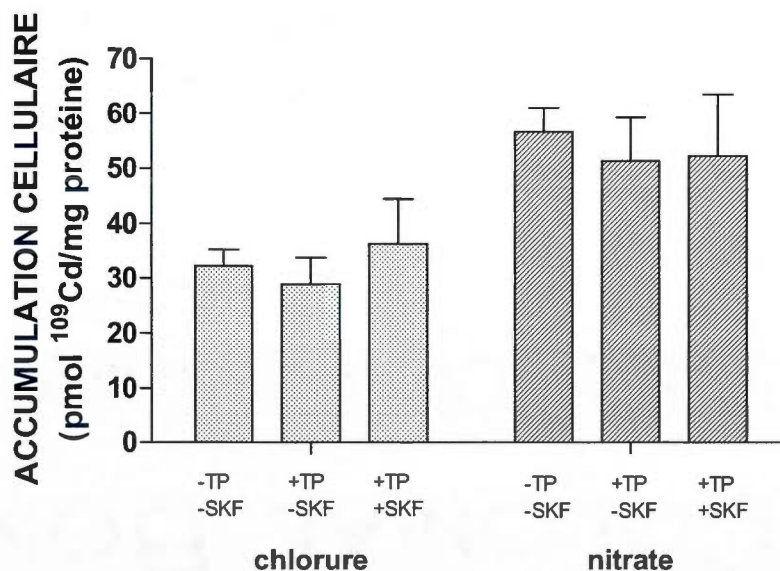
**Figure 4.9 :** Accumulation initiale (3 minutes) de  $0,5 \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$  en milieu nitrate en absence de  $\text{Ca}$ , en concentration de  $\text{K}^+$  élevée et en présence ou en absence de nifédipine ou de vérapamil dans la lignée MG-63. Les cellules ont été cultivées dans des Pétris de 35 mm pendant 6 jours. Au 6<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture a été remplacé par un milieu équivalent sans sérum pour un sevrage de 24h. Les cellules ont ensuite été exposées à  $0,5 \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$  en milieu nitrate sans  $\text{Ca}$  en concentration de  $\text{K}^+$  élevée (100 mM), en présence ou en absence (contrôle) de nifédipine ( $50 \mu\text{M}$ , préincubation 15 minutes) ou de vérapamil ( $50 \mu\text{M}$ , préincubation 15 minutes) pendant 3 minutes. Les barres représentent les moyennes  $\pm$  écart-types d'au moins trois expériences indépendantes. Aucune différence significative comparativement à la condition contrôle sans bloqueur selon le test de Dunnett à comparaison multiple.

**Tableau 4.3 :** Accumulation cellulaire (3 min) totale et spécifique de  $0,5 \mu\text{M}$  de  $^{109}\text{Cd}$  en milieu nitrate en absence de  $\text{Ca}$  avec ou sans (contrôle) nifédipine ou vérapamil. La variation correspond à la différence d'accumulation relative à la valeur contrôle.

Milieu	Accumulation totale (pmol /mg protéine)	Variation (% total)	Accumulation spécifique (pmol Cd /mg protéine)	Variation (% spécifique)
Contrôle	54,9 $\pm$ 1,5		45,8	
Nifédipine	59,9 $\pm$ 2,0	+ 9%	50,8	+ 11%
Vérapamil	57,7 $\pm$ 3,1	+ 5%	48,6	+ 6%

#### 4.1.2.7- Accumulation cellulaire de $^{109}\text{Cd}$ et canaux calciques de type TRPC

Puisque nos résultats indiquent que les VDCC ne sont pas une voie majeure d'entrée du Cd dans les cellules MG-63, nous avons exploré une autre voie calcique, cette fois indépendante du voltage, comme étant possiblement impliquée dans le transport de Cd, les canaux TRPC. Pour ce faire, nous avons utilisé, en milieu chlorure et nitrate sans Ca, la thapsigargine qui entraîne la vidange de calcium du réticulum endoplasmique et l'ouverture subséquente des TRPC de la membrane plasmique. Nous l'avons employée seule ou en combinaison avec le SKF96365, un bloqueur de TRPC. Cette utilisation combinée permet de s'assurer d'évaluer spécifiquement l'implication des TRPC dans l'accumulation du Cd. Les résultats présentés à la figure 4.10 ne montrent aucun effet significatif de la thapsigargine utilisée seule ou en combinaison avec le SKF96365 sur l'accumulation totale de  $^{109}\text{Cd}$  en milieu chlorure ou en milieu nitrate. Même en ne considérant que l'accumulation spécifique, les effets de la thapsigargine et du SKF96365 demeurent très modérés (tableau 4.4). Ainsi, les canaux de type TRPC ne semblent pas, eux non plus, impliqués de façon majeure dans le transport de Cd dans les ostéoblastes MG-63.





**Figure 4.10 : Accumulation initiale (3 minutes) de  $0,5 \mu\text{M}$   $^{109}\text{Cd}$  en milieu chlorure et nitrate sans Ca en présence ou en absence de thapsigargine ou de SKF96365 dans la lignée MG-63.** Les cellules ont été cultivées dans des Pétris de 35 mm pendant 6 jours. Au 6<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture a été remplacé par un milieu équivalent sans sérum pour un sevrage de 24h. Les cellules ont ensuite été exposées à  $0,5 \mu\text{M}$   $^{109}\text{Cd}$  en milieu chlorure ou nitrate sans Ca en présence ou en absence de thapsigargine ( $0,1 \mu\text{M}$ , préincubation 3 minutes; TP) ou de SKF96365 ( $5 \mu\text{M}$ , préincubation 15 minutes; SKF) pendant 3 minutes. Les barres représentent les moyennes  $\pm$  écart-types d'au moins quatre expériences indépendantes. Aucune différence significative comparativement à la condition contrôle sans thapsigargine ni SKF96365 selon le test de Dunnett à comparaison multiple.

**Tableau 4.4 : Accumulation cellulaire (3 min) totale et spécifique de  $0,5 \mu\text{M}$  de  $^{109}\text{Cd}$  en milieu chlorure et nitrate sans Ca en présence ou non de thapsigargine ou de SKF96365.** La variation correspond à la différence d'accumulation relative à la valeur contrôle.

Milieu	Accumulation totale (pmol /mg protéine)	Variation (% total)	Accumulation spécifique (pmol /mg protéine)	Variation (% spécifique)
<i>Chlorure</i>				
Contrôle	$32,2 \pm 6,9$		26,3	
Thapsigargine	$28,8 \pm 9,9$	- 11%	22,9	- 13%
Thapsigargine + SKF96365	$36,3 \pm 16,3$	+ 13%	30,4	+ 16%
<i>Nitrate</i>				
Contrôle	$56,6 \pm 8,8$		47,5	
Thapsigargine	$51,4 \pm 15,8$	- 9%	42,3	- 11%
Thapsigargine + SKF96365	$52,2 \pm 22,7$	- 8%	43,1	- 9%

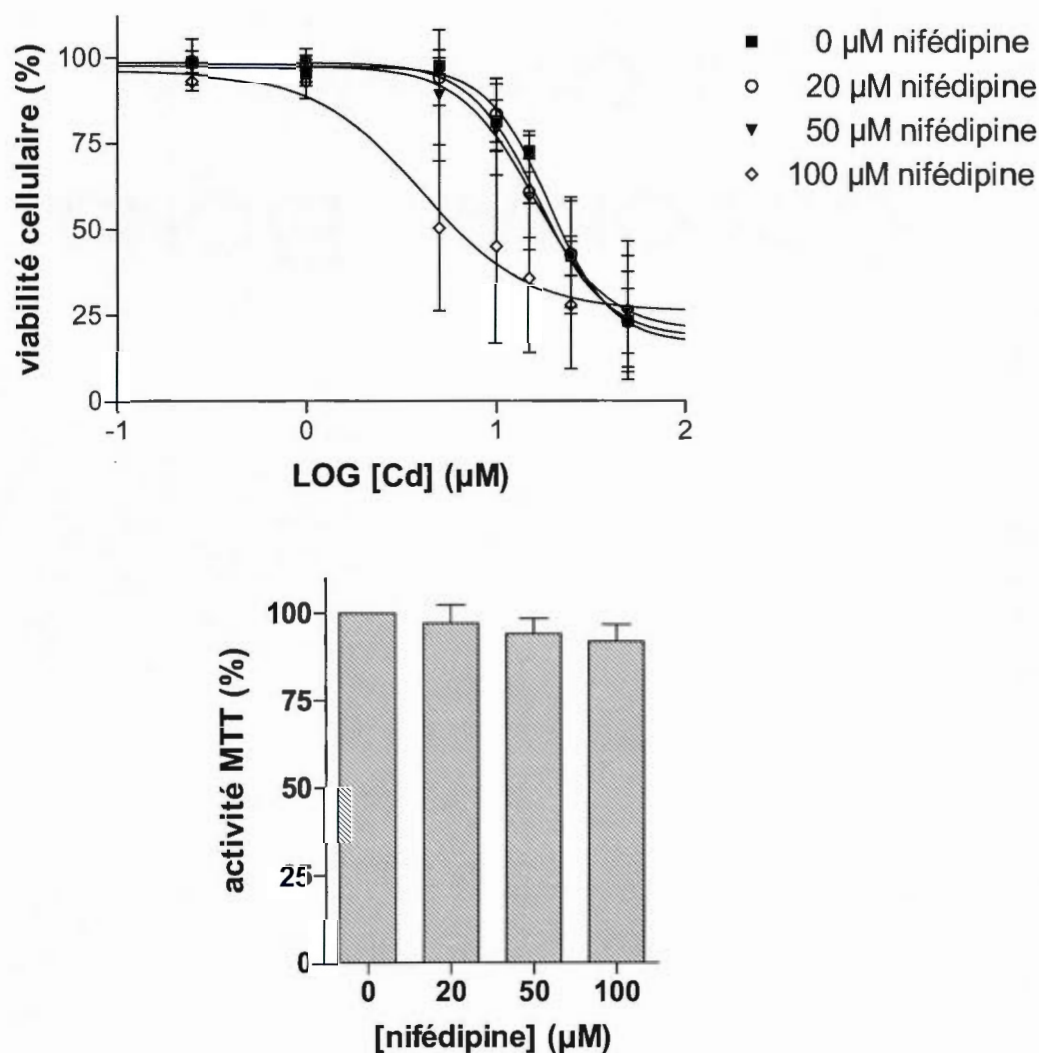
#### 4.1.3- Cytotoxicité du cadmium en présence de bloqueurs et d'ouvriers de canaux calciques pour la lignée MG-63

Nous avons voulu évaluer l'effet de sept bloqueurs ou ouvreurs de canaux calciques sur la viabilité des cellules MG-63 en milieu de culture sans sérum et en présence de concentrations de Cd variant de 0 à 50  $\mu\text{M}$ . En plus de la nifédipine et du vérapamil utilisé pour les expériences de transport, nous avons utilisé ici d'autres bloqueurs et ouvreurs afin de considérer d'autres voies d'entrée calciques pour le Cd. Également, cette étude avait pour but d'établir une corrélation entre la viabilité et l'accumulation cellulaires en présence de bloqueurs ou d'ouvreurs.

Les données obtenues à l'aide de l'essai MTT ont été analysées par régression non-linéaire (Matériel et méthodes, équation 3.4) et des valeurs de  $\text{CL}_{50}$  (représentatives du potentiel toxique) sont présentées dans les tableaux 4.2 à 4.8. De plus, les points du graphique situés entre les valeurs de viabilités maximale et minimale sont analysés par régression linéaire afin d'obtenir des valeurs de pente. Ainsi, plus la pente a une valeur élevée, plus l'impact sera grand en terme de perte de viabilité pour une légère augmentation de la concentration d'exposition au Cd. Finalement, l'efficacité du Cd est évaluée à l'aide du pourcentage de mortalité maximale pour les concentrations utilisées.

#### *4.1.3.1- Viabilité cellulaire en présence de nifédipine*

La nifédipine a été employée en tant que bloqueur des VDCC. Tel que présenté à la figure 4.11a et au tableau 4.5, la nifédipine diminue la  $\text{CL}_{50}$  du Cd, mais de façon non significative, ce qui indique que la nifédipine ne semble pas affecter la sensibilité des cellules au Cd. Les données affichent cependant une grande variation et nos résultats suggèrent une tendance à la sensibilisation des cellules au Cd, cette tendance étant plus évidente à 100  $\mu\text{M}$  de nifédipine. Les valeurs de pente et de plateau n'indiquent également aucune différence significative de cytotoxicité du Cd en présence de nifédipine. Mentionnons que le traitement à la nifédipine seule n'affecte pas significativement la viabilité des cellules (Figure 4.11b).



**Figure 4.11: Viabilité cellulaire en présence de nifédipine (entre 0 et 100 μM) et de concentrations de Cd variant entre 0,25 et 50 μM (a) et activité MTT en présence de nifédipine (entre 0 et 100 μM) seule (b) mesurée dans la lignée MG-63.** Les cellules ont été cultivées dans des plaques de 96 puits pendant 6 jours. Au 6<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture a été remplacé par un milieu équivalent sans sérum pour un sevrage de 24h. Les cellules ont ensuite été traitées pendant 24h à des concentrations de Cd variant de 0 à 50 μM et à 0, 20, 50 et 100 μM de nifédipine ajoutées au milieu de culture sans sérum. En a) les données sont exprimées en pourcentage de viabilité cellulaire en fonction du contrôle respectif (0 μM Cd) pour chacune des concentrations de nifédipine alors qu'en b) elles sont exprimées relativement à la valeur obtenue sans nifédipine. Les points représentent les moyennes ± écart-types d'au moins trois expériences

indépendantes. Aucune différence significative comparativement à la condition sans bloqueur selon le test de Dunnett à comparaison multiple (b).

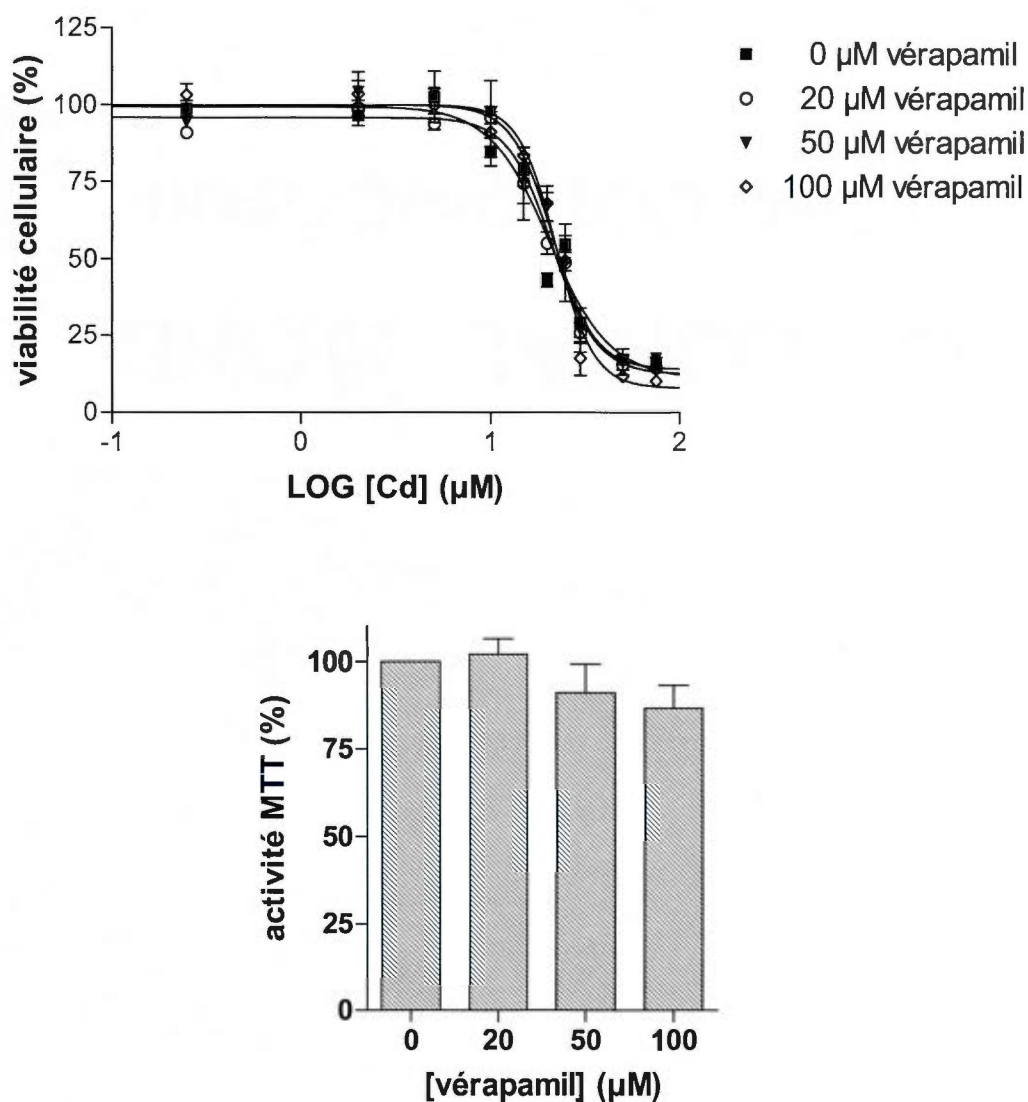
**Tableau 4.5 :** Paramètres de toxicité du Cd en présence de nifédipine à des concentrations variant entre 0 et 100  $\mu\text{M}$ .

Nifédipine	0 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
<b>CL<sub>50</sub></b> ( $\mu\text{M}$ Cd)	19 $\pm$ 4	18 $\pm$ 8	17 $\pm$ 9	5 $\pm$ 5
<b>Pente</b> (% viabilité/[Cd])	-78 $\pm$ 8	-76 $\pm$ 18	-69 $\pm$ 19	-46 $\pm$ 17
<b>Plateau</b> (% viabilité minimale)	16,8 $\pm$ 10	18,5 $\pm$ 23	20,4 $\pm$ 23	26,0 $\pm$ 19

#### 4.1.3.2- Viabilité cellulaire en présence de vérapamil

Tout comme le nifédipine, le vérapamil a été utilisé comme bloqueur des VDCC. Les données obtenues à partir de la figure 4.12a et présentées au tableau 4.6 nous montrent que le vérapamil n'affecte pas la sensibilité des cellules au Cd puisque les valeurs de CL<sub>50</sub> obtenues sont semblables et que la variation dans la valeur des pentes n'est pas significative. Les valeurs minimales de plateaux, qui varient de façon non significative selon la concentration d'exposition au vérapamil, indiquent que le Cd possède le même pouvoir de cytotoxicité maximale quelle que soit la concentration de bloqueur utilisée. Ainsi, tout comme la nifédipine, le vérapamil ne semble avoir aucun effet. Il est à mentionner que le traitement au vérapamil seul n'affecte pas significativement la viabilité des cellules bien qu'une légère diminution soit observée pour des concentrations supérieures ou égales à 50  $\mu\text{M}$  (Figure 4.12b).





**Figure 4.12: Viabilité cellulaire en présence de vérapamil (entre 0 et 100 μM) et de concentrations de Cd variant entre 0,25 et 50 μM (a) et activité MTT en présence de vérapamil (entre 0 et 100 μM) seul (b) mesurée dans la lignée MG-63.** Les cellules ont été cultivées dans des plaques de 96 puits pendant 6 jours. Au 6<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture a été remplacé par un milieu équivalent sans sérum pour un sevrage de 24h. Les cellules ont ensuite été traitées pendant 24h à des concentrations de Cd variant de 0 à 50 μM et à 0, 20, 50 et 100 μM de vérapamil ajoutées au milieu de culture sans sérum. En a), les données sont exprimées en pourcentage de viabilité cellulaire en fonction du contrôle respectif (0 μM Cd) pour chacune des concentrations de vérapamil, alors qu'en b) elles sont exprimées relativement à la valeur obtenue en absence de vérapamil. Les points

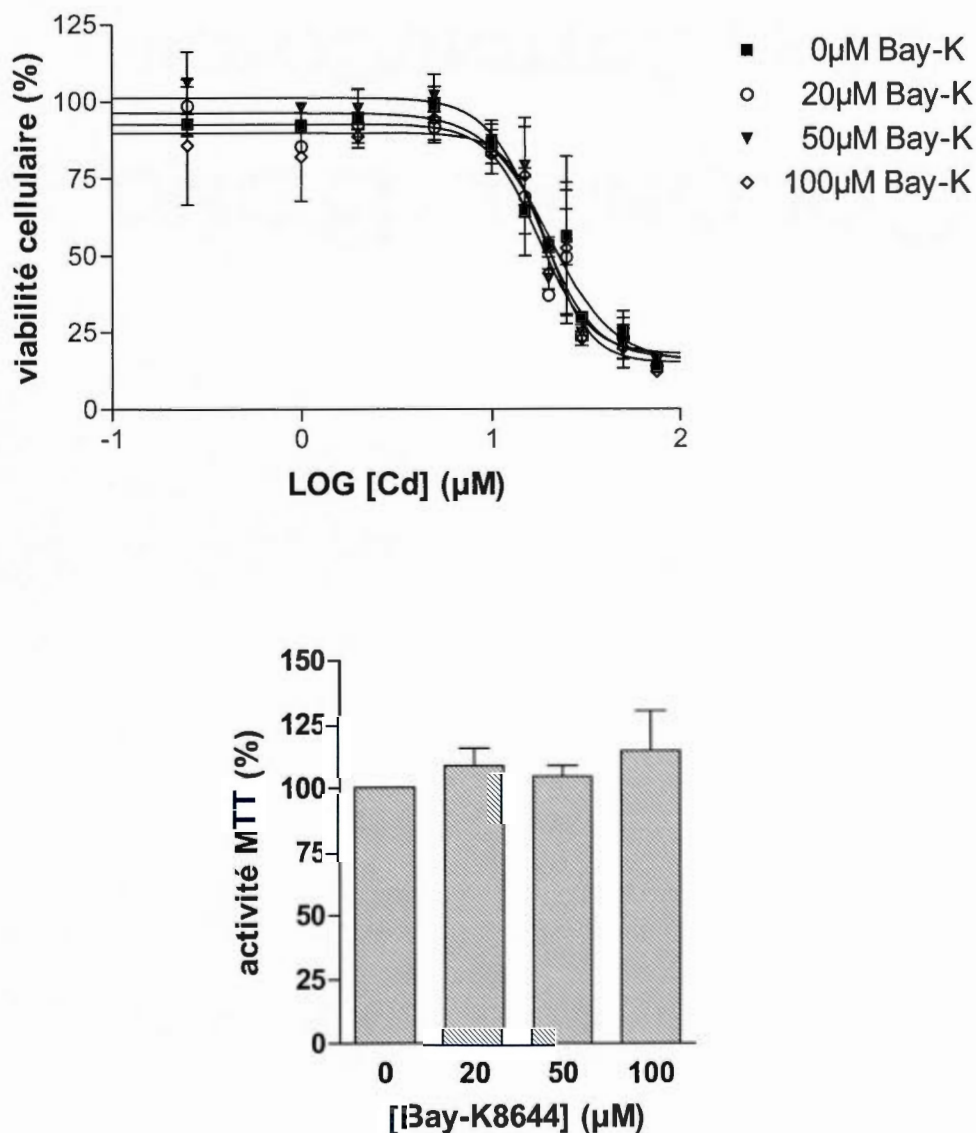
représentent les moyennes  $\pm$  écart-types d'au moins trois expériences indépendantes. Aucune différence significative comparativement à la condition sans bloqueur selon le test de Dunnett à comparaison multiple (b).

**Tableau 4.6 :** Paramètres de toxicité du Cd en présence de vérapamil à des concentrations variant entre 0 et 100  $\mu\text{M}$ .

Vérapamil	0 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
<b>CL<sub>50</sub></b> ( $\mu\text{M}$ Cd)	21 $\pm$ 2	21 $\pm$ 1	22 $\pm$ 3	22 $\pm$ 2
<b>Pente</b> (%viabilité/[Cd])	-95 $\pm$ 17	-102 $\pm$ 18	-134 $\pm$ 29	-134 $\pm$ 23
<b>Plateau</b> (% viabilité minimale)	11,2 $\pm$ 6	12,5 $\pm$ 3	14,1 $\pm$ 6	8,0 $\pm$ 5

#### 4.1.3.3- Viabilité cellulaire en présence de Bay-K8644

Par opposition aux deux bloqueurs utilisés précédemment, le Bay-K8644 a été employé en tant qu'ouvreur des VDCC. Selon la figure 4.13a et les données présentées au tableau 4.7, le Bay-K8644 ne semble pas affecter la CL<sub>50</sub> du Cd, peu importe sa concentration. Les valeurs de pente obtenues ne varient pas de façon significative, ce qui démontre que le Bay-K8644 n'affecte pas la sensibilité des cellules au Cd pour une même variation de concentration. Les valeurs de plateau de viabilités minimales obtenues ne varient pas de façon significative, ce qui montre que la toxicité maximale du Cd n'est pas affectée par la présence de Bay-K8644. Mentionnons que le traitement au Bay-K8644 seul n'affecte pas significativement la viabilité des cellules (Figure 4.13b).



**Figure 4.13: Viabilité cellulaire en présence de Bay-K8644 (entre 0 et 100 μM) et de concentrations de Cd variant entre 0,25 et 75 μM (a) et activité MTT en présence de Bay-K8644 (entre 0 et 100 μM) seul Cd (b) mesurée dans la lignée MG-63.** Les cellules ont été cultivées dans des plaques de 96 puits pendant 6 jours. Au 6<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture a été remplacé par un milieu équivalent sans sérum pour un sevrage de 24h. Les cellules ont ensuite été traitées pendant 24h à des concentrations de Cd variant de 0 à 75 μM et à 0, 20, 50 et 100 μM de Bay-K8644 ajoutées au milieu de culture sans sérum. En a), les données sont exprimées en pourcentage de viabilité cellulaire en fonction du contrôle respectif (0 μM Cd) pour chacune des concentrations de Bay-K8644, alors qu'en b) elles sont exprimées relativement à la valeur obtenue en absence de Bay-K8644. Les points

représentent les moyennes  $\pm$  écart-types d'au moins quatre expériences indépendantes. Aucune différence significative comparativement à la condition sans bloqueur selon le test de Dunnett à comparaison multiple (b).

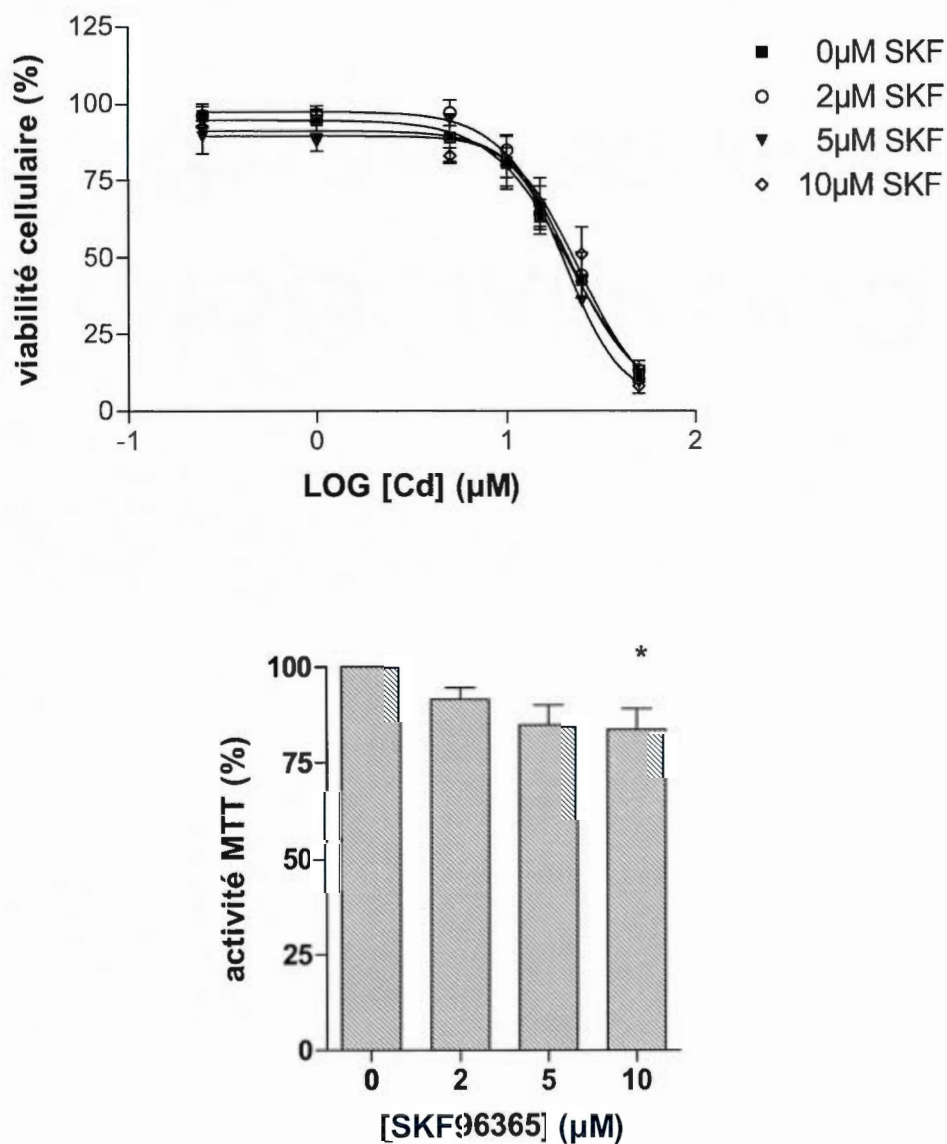
**Tableau 4.7 :** Paramètres de toxicité du Cd en présence de Bay-K8644 à des concentrations variant entre 0 et 100  $\mu\text{M}$ .

Bay-K8644	0 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
<b>CL<sub>50</sub></b> ( $\mu\text{M}$ Cd)	20 $\pm$ 4	18 $\pm$ 3	18 $\pm$ 3	20 $\pm$ 3
<b>Pente</b> (% viabilité/[Cd])	-78 $\pm$ 7	-77 $\pm$ 9	-88 $\pm$ 9	-83 $\pm$ 10,
<b>Plateau</b> (% viabilité minimale)	15,2 $\pm$ 8	17,8 $\pm$ 6	16,4 $\pm$ 6	15,2 $\pm$ 7

#### 4.1.3.4- Viabilité cellulaire en présence de SKF96365

Le SKF96365 a été utilisé pour bloquer les TRPC. D'après les résultats présentés à la figure 4.14b, lorsqu'il est utilisé en absence de Cd, le SKF96365 réduit faiblement l'activité MTT, cet effet devenant significatif à la plus forte concentration d'exposition. En faisant abstraction de cet effet, les résultats obtenus avec le SKF96365 et présentés à la figure 4.14a et au tableau 4.8 ne démontrent pas de variation significative de la CL<sub>50</sub> du Cd. De plus, les valeurs de pente ne sont pas significativement différentes les unes des autres, ce qui nous démontre que le SKF96365 n'a pas d'effet sur la sensibilité cellulaire au Cd. Les valeurs de plateau de viabilités minimales sont faibles, variant entre 0 et 6,3 indépendamment de la concentration d'exposition, ce qui montre que le SKF96365 n'a pas non plus d'effet sur le pouvoir cytotoxique maximal du Cd.





**Figure 4.14: Viabilité cellulaire en présence de SKF96365 (entre 0 et 100 μM) et de concentrations de Cd variant entre 0,25 et 50 μM (a) et activité MTT en présence de SKF96365 (entre 0 et 10 μM) seul (b) mesurée dans la lignée MG-63.** Les cellules ont été cultivées dans des plaques de 96 puits pendant 6 jours. Au 6<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture a été remplacé par un milieu équivalent sans sérum pour un sevrage de 24h. Les cellules ont ensuite été traitées pendant 24h à des concentrations de Cd variant de 0 à 50 μM et à 0, 2, 5 et 10 μM de SKF96365 ajoutées au milieu de culture sans sérum. En a), les données sont exprimées en pourcentage de viabilité cellulaire en fonction du contrôle respectif (0 μM Cd) pour chacune des concentrations de SKF96365, alors qu'en b) elles sont exprimées

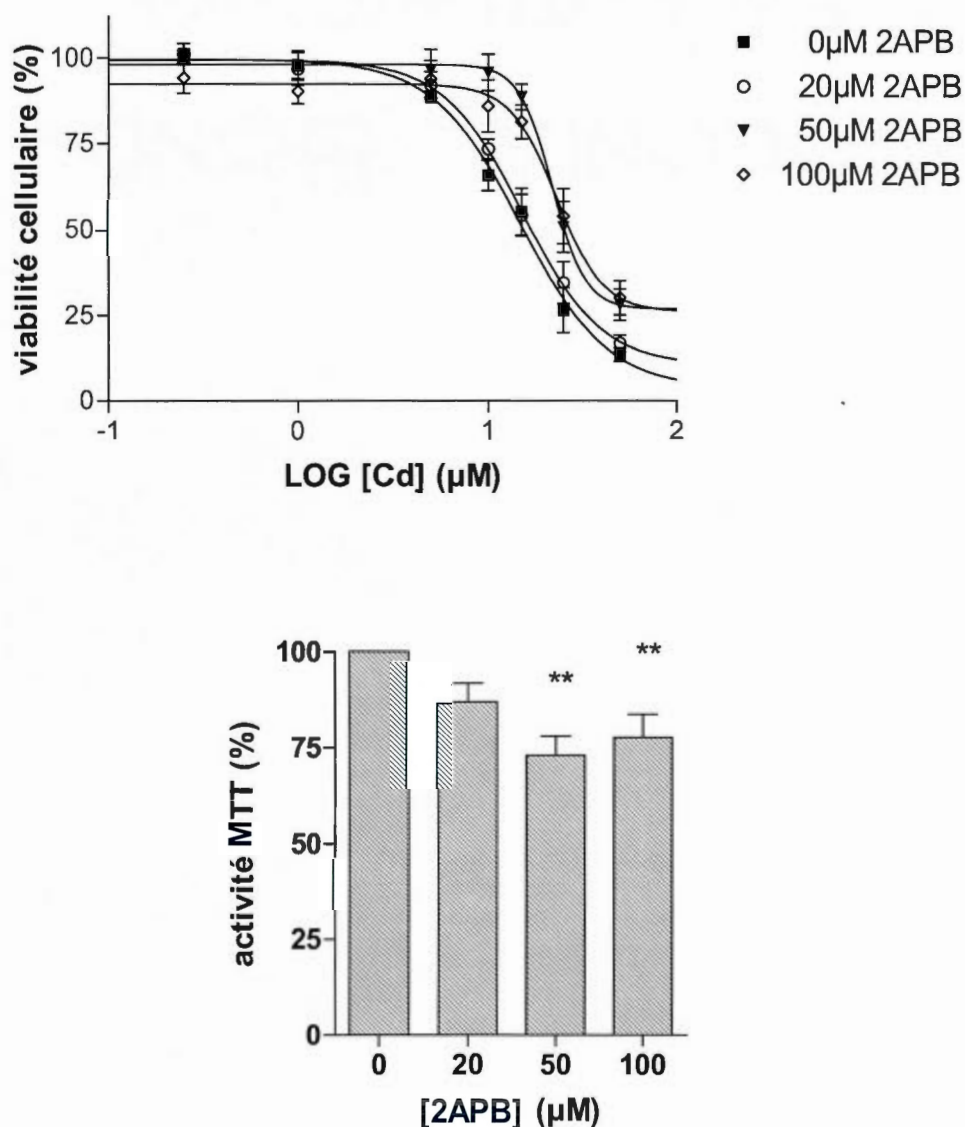
relativement à la valeur obtenu en absence de SKF96365. Les points représentent les moyennes  $\pm$  écart-types d'au moins trois expériences indépendantes. \* significativement différent comparativement à la condition sans SKF96365 selon le test de Dunnett à comparaison multiple ( $p < 0,05$ ).

**Tableau 4.8 :** Paramètres de toxicité du Cd en présence de SKF96365 à des concentrations variant entre 0 et 10  $\mu\text{M}$ .

SKF96365	0 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$
<b>CL<sub>50</sub></b> ( $\mu\text{M}$ Cd)	23 $\pm$ 8	21 $\pm$ 5	21 $\pm$ 6	25 $\pm$ 10
<b>Pente</b> (% viabilité/[Cd])	-76 $\pm$ 9	-86 $\pm$ 8	-95 $\pm$ 13	-81 $\pm$ 12
<b>Plateau</b> (% viabilité minimale)	0 $\pm$ 19	3,3 $\pm$ 13	3,6 $\pm$ 14	0 $\pm$ 21

#### 4.1.3.5- Viabilité cellulaire en présence de 2APB

Le 2APB a aussi été employé en tant que bloqueur des TRPC. Le 2APB possède une action beaucoup moins spécifique que le SKF96365. Il est aussi connu comme activateur de TRPV, de TRPM6 et comme bloqueur de TRPM7 et TRPM8. Le 2APB employé en absence de Cd fait diminuer la viabilité cellulaire, ce qui augmente avec la concentration d'exposition (figure 4.15b). En rapportant les résultats obtenus par rapport à chacune des valeurs contrôle respective (prétraitement de 2APB seul), il semble que des concentrations inférieures ou égales à 20  $\mu\text{M}$  de 2APB n'affectent pas la CL<sub>50</sub> du Cd (figure 4.15a et tableau 4.9). Cependant, lorsque la concentration d'exposition au 2APB passe de 20 à 50  $\mu\text{M}$  la CL<sub>50</sub> du Cd augmente, possiblement dû à un effet protecteur du 2APB. Le 2APB aurait aussi un effet protecteur contre la toxicité maximale du Cd puisque les valeurs de plateau de viabilité minimale sont plus élevées en présence de 50 et 100  $\mu\text{M}$  de 2APB. Les valeurs de pentes ne varient cependant pas de façon significative.



**Figure 4.15: Viabilité cellulaire en présence de 2APB (entre 0 et 100 μM) et de concentrations de Cd variant entre 0,25 et 50 μM (a) et activité MTT en présence de 2APB (entre 0 et 100 μM) seul (b) mesurée dans la lignée MG-63.** Les cellules ont été cultivées dans des plaques de 96 puits pendant 6 jours. Au 6<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture a été remplacé par un milieu équivalent sans sérum pour un sevrage de 24h. Les cellules ont ensuite été traitées pendant 24h à des concentrations de Cd variant de 0 à 50 μM et à 0, 20, 50 et 100 μM de 2APB ajoutées au milieu de culture sans sérum. En a), les données sont exprimées en pourcentage de viabilité cellulaire en fonction du contrôle respectif (0 μM Cd) pour chacune des concentrations de 2APB, alors qu'en b) elles sont exprimées

relativement à la valeur obtenue en absence de 2APB. Les points représentent les moyennes  $\pm$  écart-types d'au moins trois expériences indépendantes. \*\* significativement différent comparativement à la condition sans 2APB selon le test de Dunnett à comparaison multiple ( $p < 0,01$ ).

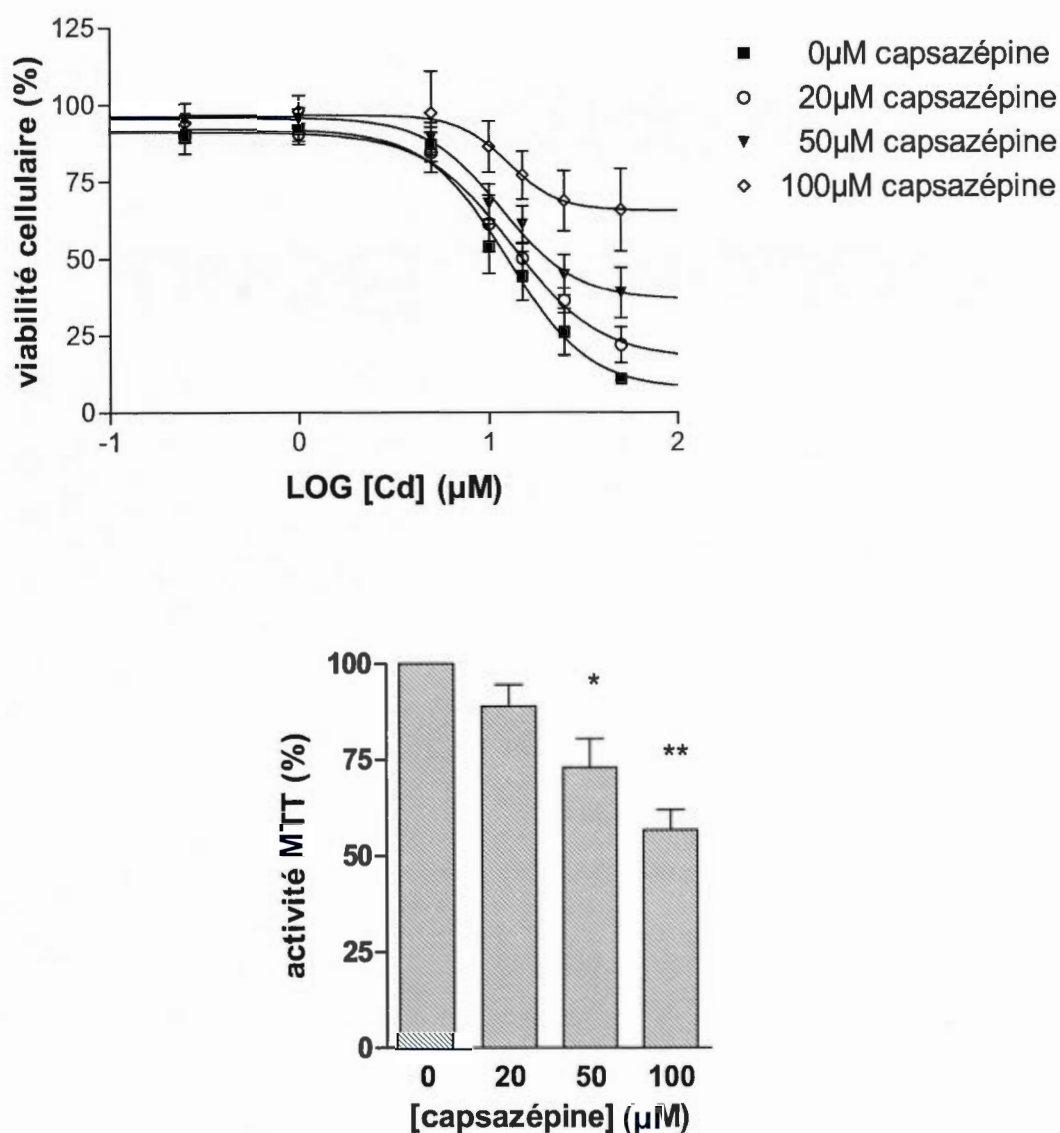
**Tableau 4.9 :** Paramètres de toxicité du Cd en présence de 2APB à des concentrations variant entre 0 et 100  $\mu\text{M}$ .

2APB	0 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
<b>CL<sub>50</sub></b> ( $\mu\text{M}$ Cd)	15 $\pm$ 3	15 $\pm$ 3	22 $\pm$ 2	24 $\pm$ 4
<b>Pente</b> (% viabilité/[Cd])	-80 $\pm$ 7	-78 $\pm$ 6	-105 $\pm$ 12	-100 $\pm$ 14
<b>Plateau</b> (% viabilité minimale)	3,7 $\pm$ 10	10,44 $\pm$ 9	26,8 $\pm$ 6	21,56 $\pm$ 10

#### 4.1.3.6- Viabilité cellulaire en présence de capsazépine

Nous avons utilisé la capsazépine en tant que bloqueur des TRPM8. Lorsqu'elle est employée en absence de Cd, nos résultats, présentés à la figure 4.16b, démontrent que la capsazépine réduit l'activité MTT (perte de viabilité cellulaire), et ce de façon dose-dépendant. Les résultats obtenus avec la capsazépine et le Cd, une fois exprimés par rapport à la valeur contrôle respective, signalent que la valeur de CL<sub>50</sub> du Cd ne varie pas de façon significative en présence du bloqueur (Figure 4.16a, tableau 4.10). Les valeurs de pente ne sont pas significativement différentes. Les valeurs de plateau de viabilités minimales augmentent avec la concentration du bloqueur. La capsazépine semble protéger les cellules en diminuant le pouvoir cytotoxique maximal du Cd.





**Figure 4.16: Viabilité cellulaire en présence de capsazépine (entre 0 et 100 μM) et de concentrations de Cd variant entre 0,25 et 50 μM (a) et activité MTT en présence de capsazépine (entre 0 et 100 μM) seule (b) mesurée dans la lignée MG-63.** Les cellules ont été cultivées dans des plaques de 96 puits pendant 6 jours. Au 6<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture a été remplacé par un milieu équivalent sans sérum pour un sevrage de 24h. Les cellules ont ensuite été traitées pendant 24h à des concentrations de Cd variant de 0 à 50 μM et à 0, 20, 50 et 100 μM de capsazépine ajoutées au milieu de culture sans sérum. En a), les données sont exprimées en pourcentage de viabilité cellulaire en fonction du contrôle respectif (0 μM Cd) pour chacune des concentrations de capsazépine, alors qu'en b) elles sont

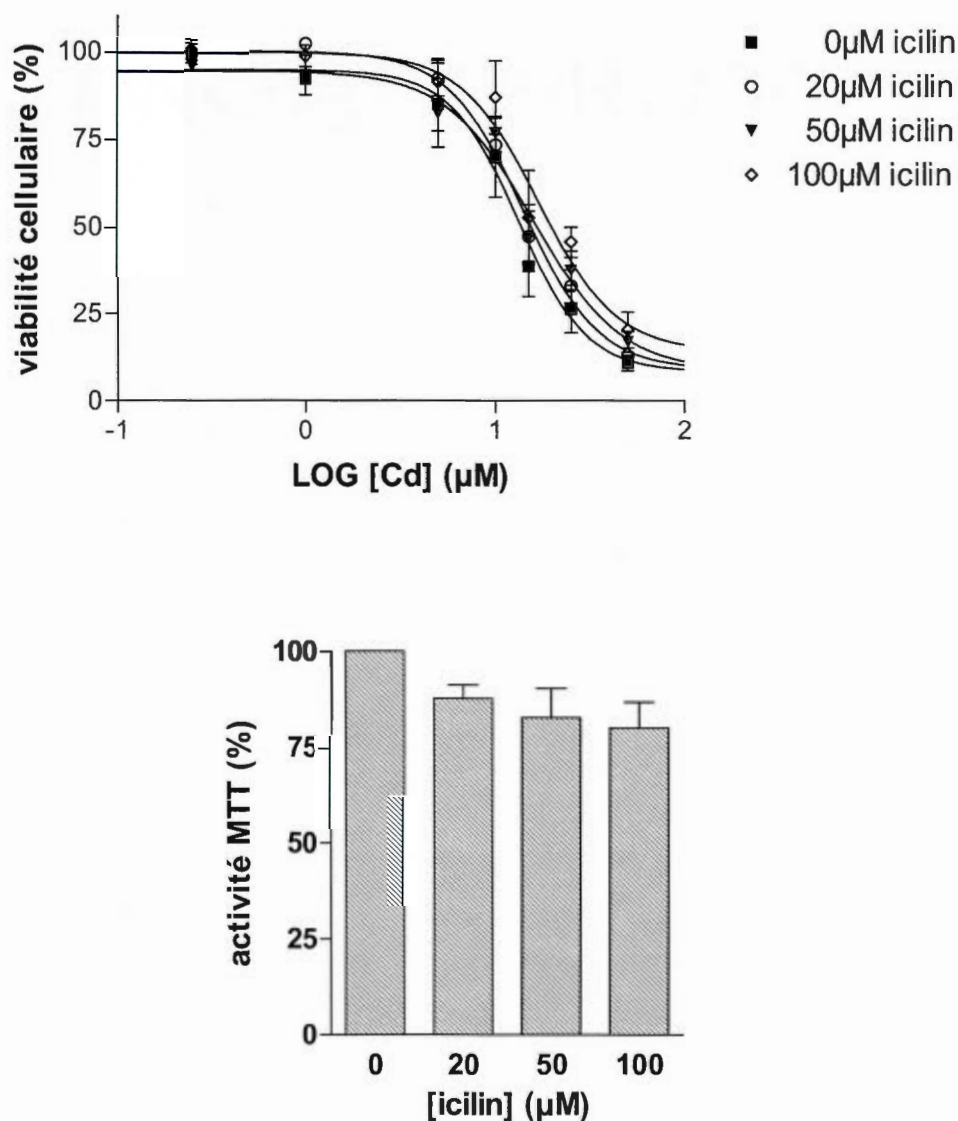
exprimées relativement à la valeur obtenue en absence de capsazépine. Les points représentent les moyennes  $\pm$  écart-types d'au moins trois expériences indépendantes. \* et \*\* significativement différent comparativement à la condition sans capsazépine selon le test de Dunnett à comparaison multiple (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

**Tableau 4.10:** Paramètres de toxicité du Cd en présence de capsazépine à des concentrations variant entre 0 et 100  $\mu\text{M}$ .

capsazépine	0 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
<b>CL<sub>50</sub></b> ( $\mu\text{M Cd}$ )	13 $\pm$ 3	14 $\pm$ 4	12 $\pm$ 4	13 $\pm$ 6
<b>Pente</b> (% viabilité/[Cd])	-85 $\pm$ 15	-68 $\pm$ 12	-63 $\pm$ 9	-42 $\pm$ 18
<b>Plateau</b> (% viabilité minimale)	7,6 $\pm$ 10	17,5 $\pm$ 11	36,8 $\pm$ 8	65,7 $\pm$ 8

#### 4.1.3.7- Viabilité cellulaire en présence d'icilin

Contrairement à la capsazépine, l'icilin a été employé comme ouvreur des TRPM8. Les résultats de la figure 4.17b montrent que lorsque l'icilin est présent seul dans le milieu d'exposition, il exerce un léger effet cytotoxique dépendant de la concentration mais non significatif. Les résultats présentés à la figure 4.17a et au tableau 4.11 suggèrent que la valeur de CL<sub>50</sub> du Cd n'est pas affectée par la présence d'icilin quelque soit sa concentration. De même, les valeurs de pente ainsi que de toxicité maximale ne varient pas de façon significative.



**Figure 4.17: Viabilité cellulaire en présence de icilin (entre 0 et 100 μM) et de concentrations de Cd variant entre 0,25 et 50 μM (a) et activité MTT en présence de icilin (entre 0 et 100 μM) seul (b) mesurée dans la lignée MG-63.** Les cellules ont été cultivées dans des plaques de 96 puits pendant 6 jours. Au 6<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture a été remplacé par un milieu équivalent sans sérum pour un sevrage de 24h. Les cellules ont ensuite été traitées pendant 24h à des concentrations de Cd variant de 0 à 50 μM et à 0, 20, 50 et 100 μM de icilin ajoutées au milieu de culture sans sérum. En a), les données sont exprimées en pourcentage de viabilité cellulaire en fonction du contrôle respectif (0 μM Cd) pour chacune des concentrations de icilin, alors qu'en b) elles sont exprimées

relativement à la valeur obtenue en absence de icilin. Les points représentent les moyennes  $\pm$  écart-types d'au moins trois expériences indépendantes. Aucune différence significative comparativement à la condition sans bloqueur selon le test de Dunnett à comparaison multiple.

**Tableau 4.11:** Paramètres de toxicité du Cd en présence de icilin à des concentrations variant entre 0 et 100  $\mu\text{M}$ .

Icilin	0 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
<b>CL<sub>50</sub></b> ( $\mu\text{M}$ Cd)	14 $\pm$ 4	14 $\pm$ 3	15 $\pm$ 3	17 $\pm$ 6
<b>Pente</b> (% viabilité/[Cd])	-88 $\pm$ 19	-89 $\pm$ 11	-78 $\pm$ 15	-73 $\pm$ 19
<b>Plateau</b> (% viabilité minimale)	8,4 $\pm$ 12	9,1 $\pm$ 8	13,85 $\pm$ 10	14,2 $\pm$ 17

#### 4.1.4- Comparaison entre la lignée MG-63 et deux autres modèles cellulaires ostéoblastiques, SaOS-2 et U2OS

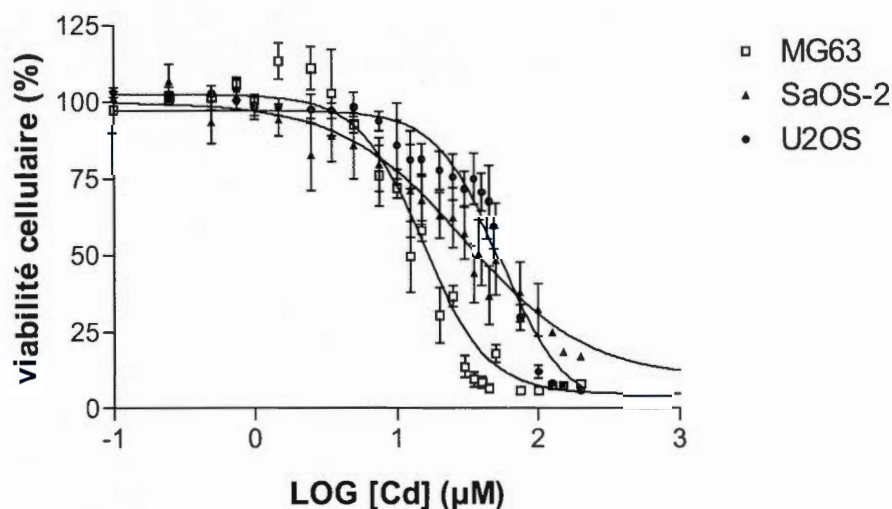
##### 4.1.4.1- Viabilité cellulaire en fonction de l'augmentation de la concentration de cadmium dans les trois lignées

En plus de la lignée MG-63, nous nous sommes intéressés à deux autres modèles ostéoblastiques humains, la lignée SaOS-2 et la lignée U2OS. Il est intéressant de comparer quelques résultats préliminaires obtenus avec ces deux autres lignées et de souligner leurs différences et leurs ressemblances.

En premier lieu, nous avons comparé la toxicité du Cd ajouté à un milieu de culture sans sérum pour ces trois lignées. La figure 4.18 montre qu'une augmentation de la concentration de Cd dans le milieu de culture réduit graduellement la viabilité des cellules, et ce pour les trois lignées. L'analyse des courbes de viabilité a permis d'obtenir les valeurs de CL<sub>50</sub> pour chaque lignée (tableau 4.12). Ces valeurs démontrent que la lignée MG-63, qui possède la CL<sub>50</sub> la plus faible, est plus sensible



au Cd que la lignée U2OS pour laquelle le Cd possède la  $CL_{50}$  la plus élevée. Les différences entre les valeurs de pente de toxicité entre les lignées MG-63 et U2OS d'une part, de même qu'entre les lignées SaOS-2 et U2OS d'autre part, ne sont pas significatives. Cependant, les pentes de toxicité entre les lignées MG-63 et SaOS-2 sont significativement différentes et indiquent que la lignée MG-63 est plus sensible à une légère augmentation de la concentration de Cd. C'est dans la lignée U2OS que le plateau de viabilités minimales est le plus faible (toxicité maximale plus importante), suivie de la lignée MG-63 puis de la lignée SaOS-2.



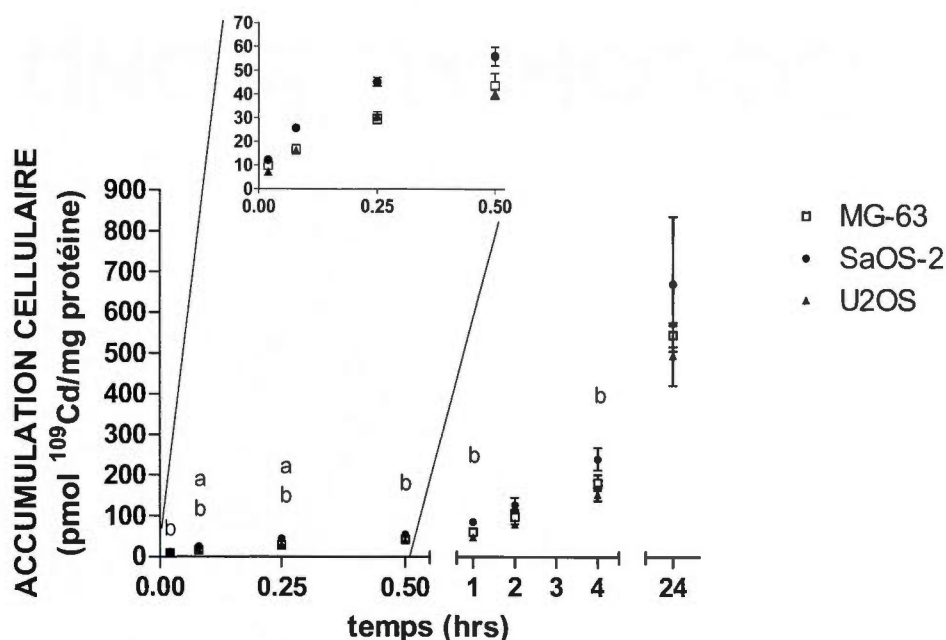
**Figure 4.18 : Viabilité cellulaire et comparaison des  $CL_{50}$  à l'aide de l'essai MTT dans les lignées MG-63, SaOS-2 et U2OS.** Les cellules ont été cultivées dans des plaques de 96 puits pendant 6 jours. Au 6<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture a été remplacé par un milieu équivalent sans sérum pour un sevrage de 24h. Les cellules ont ensuite été traitées à des concentrations de Cd variant de 0,5 à 200 µM ajoutées au milieu de culture sans sérum. Les données sont exprimées en pourcentage de viabilité cellulaire en fonction du contrôle. Les points représentent les moyennes  $\pm$  écart-types d'au moins trois expériences indépendantes.

**Tableau 4.12:** Paramètres de toxicité du Cd dans les lignées MG-63, SaOS-2 et U2OS

	<b>MG-63</b>	<b>SaOS-2</b>	<b>U2OS</b>
<b>CL<sub>50</sub></b> (μM Cd)	16 ± 2	30 ± 6	55 ± 4
<b>Pente</b> (% viabilité/[Cd])	-82 ± 6	-37 ± 4	-83 ± 9
<b>Plateau</b> (% viabilité)	5 ± 4	10 ± 3	0 ± 2

*4.1.4.2- Accumulation cellulaire de <sup>109</sup>Cd en fonction du temps dans les trois lignées*

Ensuite, nous avons mesuré l'accumulation cellulaire de <sup>109</sup>Cd en milieu de culture sans sérum, sur une période de 24 heures, dans les trois lignées. Nos résultats présentés à la figure 4.19 indiquent qu'il n'existe aucune différence significative dans le transport de Cd entre les lignées MG-63 et U2OS. Cependant, la lignée SaOS-2 se distingue de la lignée U2OS par une accumulation significativement plus élevée à tous les temps à l'exception de 2 et 24 heures. L'accumulation de Cd est aussi significativement plus grande pour la lignée SaOS-2 que pour la lignée MG-63 à 5 et 15 minutes. Il est à noter qu'il n'y a pas de différence significative d'accumulation entre chaque lignée après 24 heures.

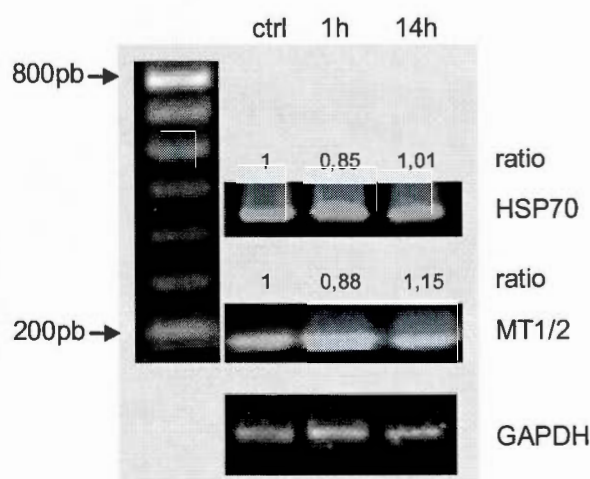


**Figure 4.19 : Accumulation cellulaire de  $^{109}\text{Cd}$  en fonction du temps dans les cellules MG-63, SaOS-2 et U2OS.** Les cellules ont été cultivées dans des Pétris de 35 mm pendant 6 jours. Au 6<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture a été remplacé par un milieu équivalent sans sérum pour un sevrage de 24h. Les cellules ont été exposées à  $0,5 \mu\text{M}$   $^{109}\text{Cd}$  en milieu de culture sans sérum pour les durées suivantes : 1, 5, 15, 30 minutes et 1, 2, 4 et 24 heures. Les points représentent les moyennes  $\pm$  écart-types d'au moins trois expériences indépendantes. a = différence significative entre MG-63 et SaOS-2 et b = entre SaOS-2 et U2OS selon une analyse de variance (ANOVA) suivi du test de Tukey à comparaison multiple ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.4.3- Effet du cadmium sur l'expression d'ARN messenger de métallothionéines et de HSP70 dans les trois lignées

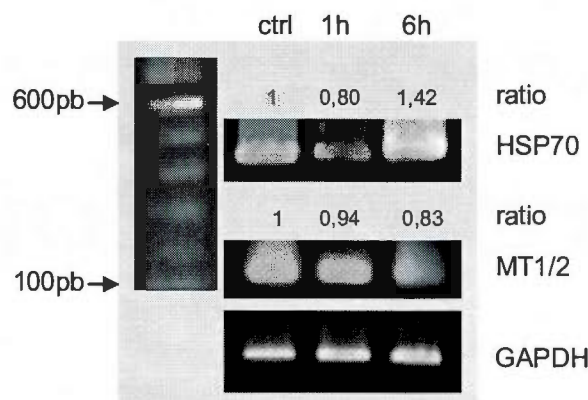
Nous avons fait quelques expériences préliminaires avec les trois lignées afin de vérifier si la présence de Cd dans le milieu d'exposition induit la synthèse d'ARNm de MTs et de HSP70, deux protéines connues pour leur rôle protecteur. Les résultats préliminaires présentés aux figures 4.20 à 4.22 n'indiquent aucune induction

de HSP70 ou de MTs, que ce soit à 1, 6, 14 ou 24 heures. Notons que les ratios présentés dans ces figures sont normalisés par rapport au ratio Ctrl (soit MT1/2 / GAPDH = 1). Chacune des lignées expriment les ARNm de MTs et de HSP70, tant pour les cellules non exposées (contrôle) que pour les cellules exposées au Cd.

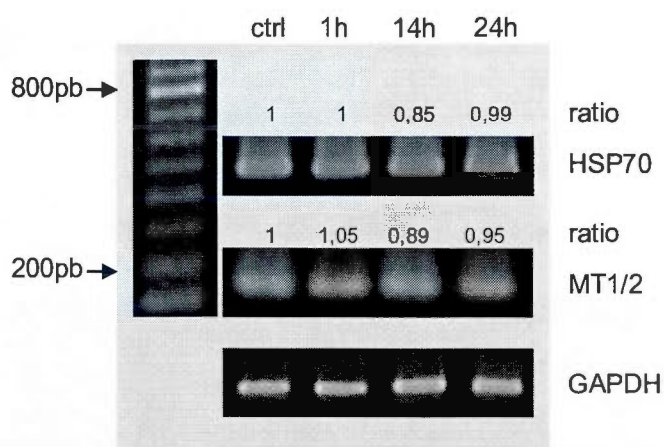


**Figure 4.20 : Amplification par RT-PCR des ARN messagers de métallothionéines et de HSP70 dans la lignée MG-63.** Les cellules ont été cultivées dans des Pétris de 60 mm pendant 6 jours. Au 6<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture a été remplacé par un milieu équivalent sans sérum pour un sevrage de 24h (contrôle :ctrl). Les cellules ont été ensuite exposées à 10  $\mu$ M Cd en milieu de culture sans sérum pendant 1h et 4h. Le marqueur de longueur de nucléotide est à gauche. Les produits de RT-PCR ont été révélés sur gel d'agarose tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. Les niveaux d'expression de MT1/2 et de HSP70 sont d'abord normalisés en fonction de l'expression de GAPDH, puis les ratios sont exprimés par rapport au ratio Ctrl fixé à 1.





**Figure 4.21 : Amplification par RT-PCR des ARN messager de métallothionéines et de HSP70 dans la lignée SaOS-2.** Les cellules ont été cultivées dans des Pétris de 60 mm pendant 6 jours. Au 6<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture a été remplacé par un milieu équivalent sans sérum pour un sevrage de 24h (contrôle :ctrl). Les cellules ont été ensuite exposées à 10  $\mu$ M Cd en milieu de culture sans sérum pendant 1h et 6h. Le marqueur de longueur de nucléotides. Les produits de RT-PCR ont été révélés sur gel d'agarose tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. Les niveaux d'expression de MT1/2 et de HSP70 sont d'abord normalisés en fonction de l'expression de GAPDH, puis les ratios sont exprimés par rapport au ratio Ctrl fixé à 1.



**Figure 4.22 : Amplification par RT-PCR des ARN messager de métallothionéines et de HSP70 dans la lignée U2OS.** Les cellules ont été

cultivées dans des Pétris de 60 mm pendant 6 jours. Au 6<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture a été remplacé par un milieu équivalent sans sérum pour un sevrage de 24h (contrôle :ctrl). Les cellules ont été ensuite exposées à 10  $\mu$ M Cd en milieu de culture sans sérum pendant 1h, 14h et 24h. Le marqueur de longueur de nucléotides est à gauche. Les produits de RT-PCR ont été révélés sur gel d'agarose tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. Les niveaux d'expression de MT1/2 et de HSP70 sont d'abord normalisés en fonction de l'expression de GAPDH, puis les ratios sont exprimés par rapport au ratio Ctrl fixé à 1.

## CHAPITRE 5

### 5.1- DISCUSSION

#### 5.1.1- Cytotoxicité du cadmium et mécanismes de résistance

La toxicité du Cd dans les cellules ostéoblastiques MG-63 a été évaluée à l'aide de l'essai MTT après une exposition de 24 heures. Cet essai est utilisé couramment afin de quantifier la cytotoxicité d'une variété de composés (Mosmann, 1983; Loveland *et al.*, 1992; Hussaïn *et al.*, 1993; Watjen *et al.*, 2002; Dehn *et al.*, 2004). Les résultats obtenus nous démontrent clairement que le Cd est cytotoxique pour les ostéoblastes MG-63 ( $CL_{50} = 15,5 \pm 1,1 \mu M$ ; figure 4.1). De même, le Cd est cytotoxique pour les lignées d'ostéoblastes SaOS-2 et U2OS (figure 4.18). La cytotoxicité observée pour ces deux lignées est cependant moins importante ( $CL_{50}$  respectives de  $30 \pm 6$  et  $55 \pm 4 \mu M$ ). Les différentes valeurs de  $CL_{50}$  obtenues sur les trois lignées nous indiquent que le Cd peut être jusqu'à 3 fois plus toxique dans les cellules MG-63. Des essais de cytotoxicité réalisés sur d'autres types cellulaires démontrent également une grande variabilité dans les valeurs de  $CL_{50}$  obtenues. Par exemple, Qu *et al.* (2005) ont obtenu une valeur de  $CL_{50}$  de  $3,5 \pm 0,4 \mu M$  en utilisant les cellules épithéliales hépatiques TRL1215 et le réactif d'Owen pour quantifier le formazan formé après 24 heures d'exposition au Cd. La valeur de  $CL_{50}$  obtenue à l'aide de l'essai MTT, toujours après 24 heures, est de  $0,7 \mu M$  dans les cellules C7 provenant d'un gliome (tumeur cérébrale) (Watjen *et al.*, 2002), de  $6,2 \mu M$  dans les hépatocytes de la lignée HepG<sub>2</sub> (Dehn *et al.*, 2004) et de  $50-60 \mu M$  dans la lignée cellulaire LLC-PK1 dérivée de cellules du tubule rénal proximal (Olabarrietaa *et al.*, 2001). Pour le même essai effectué sur des cultures primaires d'hépatocytes, Delraso et son équipe (2003) ont obtenu une valeur de  $14,3 \pm 3,9 \mu M$  après 23 heures d'exposition et Fotakis et ses collègues (2006a) ont obtenu une valeur de  $15 \mu M$  après 24 heures, ces valeurs étant comparables à celle obtenue dans nos travaux avec

la lignée MG-63. À notre connaissance, c'est la première fois que des valeurs de  $CL_{50}$  sont estimées pour des lignées de cellules ostéoblastiques.

Pour causer la toxicité observée, le Cd doit entrer dans les ostéoblastes. Les résultats obtenus nous indiquent que l'accumulation du Cd, mesurée sur une période de 24 heures, augmente en fonction du temps. Puisqu'il n'y a pas de différence d'accumulation observable entre les trois lignées après 24 heures (figure 4.19), la plus grande sensibilité au Cd de la lignée MG-63 ne peut être liée à une plus grande accumulation. Il semble donc que la variation de sensibilité soit liée à certains mécanismes cellulaires qui réduisent la toxicité du Cd et diffèrent entre les lignées. La lignée U2OS, qui possède la valeur de  $CL_{50}$  la plus élevée des trois, semble être en mesure de mieux se protéger.

Certains mécanismes de protection, telle la présence ou l'induction de MTs et de HSP70, peuvent intervenir dans cette gestion de la toxicité du Cd intracellulaire. Parmi tous les métaux, le Cd est celui qui possède la plus grande capacité d'induction des MTs (Waalkes et Ward, 1989). À l'aide de lignées cellulaires ou de souris transgéniques, il a été montré qu'une déficience en MT augmente la sensibilité au Cd (Klassen *et al.*, 1999). Bien que chacune des lignées ostéoblastiques employées exprime les ARNm de MTs et de HSP70, nos essais préliminaires n'indiquent aucune induction de MTs (figures 4.20-4.22). Ce dernier résultat n'appuie pas notre hypothèse voulant que les lignées déficientes en p53 (MG-63 et SaOS-2) possèdent un niveau nul d'induction des MTs comparativement à la lignée U2OS, p53 compétente. Cependant, nous maintenons notre hypothèse, puisque d'autres essais doivent encore être réalisés. Rappelons que cette hypothèse était basée sur les observations de Fan et Cherian (2002) qui ont montré qu'une lignée de cellules épithéliales provenant d'un cancer du sein et p53 déficiente était incapable de surexprimer les MTs ou d'initier l'apoptose après l'addition de Cd au milieu de culture, contrairement à la même lignée p53 compétente.

De plus, une variation remarquable dans le niveau d'expression des MTs dans le foie, les reins et les globules rouges a été rapportée chez l'humain (Heilmaier *et al.*,



1987; Silevis-Smitt *et al.*, 1992; Yoshida *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2000). Nous croyons que les ostéoblastes n'échappent pas à cette variation et c'est pourquoi il serait intéressant de comparer le niveau d'expression basale de ces ARNm dans les trois modèles cellulaires. Ainsi, il faudrait faire migrer les produits de PCR de GAPDH et de MTs de chaque lignée sur un même gel d'agarose et comparer les niveaux de ARNm de MTs normalisés sur ceux de GAPDH. Une même réaction de PCR menée parallèlement sur les trois lignées serait aussi préférable. Notons que pour une suite d'expériences futures, il serait intéressant d'évaluer si le sevrage en FBS modifie les niveaux de MTs et de HSP70 afin de s'assurer si le sevrage en lui-même induit l'expression de MTs ou de HSP70 auquel cas, l'effet du Cd pourrait être mal-évalué. Aussi, il faut mentionner que nous avons examiné l'expression des ARNm exclusivement. Il est possible que le niveau des transcrits ne reflète pas la quantité de protéines matures. Voilà pourquoi étudier l'expression de ces protéines serait également souhaitable. Il faudrait aussi vérifier les conditions d'amplification afin de s'assurer que les cycles de PCR sont optimisés et les réactions d'amplification non saturées afin de générer des quantités optimales d'amplicons (portion linéaire d'amplification). Finalement, il est aussi possible que le système GSH soit un élément important impliqué dans la protection des ostéoblastes contre la toxicité du Cd et que la capacité de ce type de protection varie d'une lignée ostéoblastique à l'autre. Vérifier si l'expression même de GSH peut varier après exposition au Cd serait alors pertinent.

#### 5.1.2- Transport de cadmium et spéciation inorganique

L'étude de l'accumulation de  $^{109}\text{Cd}$  sur temps courts a permis de caractériser le transport de ce métal dans les cellules MG-63. La présence de Cd non radioactif en concentration jusqu'à 200 fois plus élevée que le traceur, utilisé en tant qu'inhibiteur compétitif, a fortement diminué l'accumulation de  $^{109}\text{Cd}$  démontrant clairement la présence de mécanismes spécifiques impliqués dans le transport de Cd dans les ostéoblastes MG-63. La portion de  $^{109}\text{Cd}$  qui n'est pas inhibée peut être attribuée au

transport non spécifique (diffusion passive). Les résultats obtenus à partir d'études d'accumulation de Cd réalisées sur les cellules entérocytaires TC7 (Jumarie *et al.*, 1997) et HIEC (Bergeron et Jumarie, 2006) démontrent également l'implication parallèle de mécanismes de transport spécifiques et non spécifiques.

À partir des résultats de transport obtenus sur temps courts en présence et en absence de 100  $\mu\text{M}$  de Cd, le temps de transport initial a été fixé à 3 minutes afin d'obtenir un rapport signal-bruit suffisant. Cependant, il est important de souligner que la détermination des paramètres cinétiques  $V_{\text{max}}$  et  $K_m$  doit optimalement être faite en conditions de vitesse initiale (conditions de linéarité d'accumulation en fonction du temps). Nous considérons toutefois que la vitesse d'accumulation mesurée à 3 minutes est suffisamment représentative de la phase membranaire du processus d'accumulation bien que la valeur de vitesse initiale soit sous-évaluée.

La valeur de  $V_{\text{max}}$  pour le transport de Cd en milieu chlorure obtenue dans la lignée MG-63 ( $261 \pm 59$  pmol/3min/mg protéine; figure 4.4) diffère peu de celles obtenues par Bergeron et Jumarie (2006) dans les cellules intestinales HIEC ( $342 \pm 76$  pmol/3min/mg protéine) et par Pham *et al.* (2004) ( $219 \pm 45$  pmol/min/mg protéine) dans les cultures primaires d'hépatocytes de rat dans les mêmes conditions expérimentales. Par contre, les valeurs de  $K_m$  sont différentes ( $13,5 \pm 2,7$  dans les cellules MG-63;  $5,1 \pm 1,1$   $\mu\text{M}$  dans les cellules HIEC et  $3,5 \pm 0,8$   $\mu\text{M}$  dans les hépatocytes) indiquant ainsi des affinités variables pour le transport de Cd selon le type cellulaire. La concentration de  $^{109}\text{Cd}$  utilisée ici (0,5 $\mu\text{M}$ ) étant très faible comparativement au  $K_m$  obtenu alors que la concentration de Cd étant saturante, les conditions expérimentales de déplacement du  $^{109}\text{Cd}$  par le Cd (i.e. inhibition du transport du traceur par le Cd) apparaissent optimales. La valeur de  $k_D$  obtenue dans les cellules MG-63 est  $7,9 \pm 0,9$  pmol/3 min/mg protéine/ $\mu\text{M}$ . Il semble que le transport non spécifique varie dépendamment des lignées étudiées. En utilisant un milieu chlorure et la même technique de déplacement du traceur par le Cd, Bergeron et Jumarie (2006) ont obtenu une valeur de  $k_D$  de  $31,5 \pm 2,6$  pmol/3 min/mg

protéine/ $\mu\text{M}$  alors que Pham *et al.* (2004) ont obtenu une valeur de  $20 \pm 2$  pmol/min/mg protéine/ $\mu\text{M}$ . La composante non spécifique du transport de Cd varie donc aussi selon le type cellulaire.

Selon l'étude de spéciation d'Élisma et Jumarie (2001), l'accumulation non spécifique de Cd ne varie pas en fonction de sa spéciation inorganique (modifiée à l'aide de milieu chlorure ou nitrate). Logiquement, le transport non spécifique ne devrait pas changer si, dans les deux milieux d'exposition, les mêmes formes chimiques entrent par diffusion passive dans les mêmes proportions. Cependant, nos résultats ne concordent pas avec cette logique. Il est étonnant qu'en milieu nitrate, où la concentration de  $\text{Cd}^{2+}$  est beaucoup plus grande qu'en milieu chlorure, le transport non spécifique soit plus élevé (figure 4.6) étant donné qu'une moins grande perméabilité passive est suspectée pour le  $\text{Cd}^{2+}$  comparativement aux chlorocomplexes. Dans l'étude de Bergeron et Jumarie (2006), l'accumulation non spécifique de  $^{109}\text{Cd}$  dans les cellules HIEC est également plus grande en milieu nitrate, mais sa contribution au transport total demeure similaire. Il en est de même pour nos résultats qui montrent qu'en milieu chlorure et en milieu nitrate, la contribution de l'accumulation non spécifique à l'accumulation totale est respectivement de 16% et 18% après trois minutes. Bien que l'accumulation totale augmente de 76% en milieu nitrate, aucune corrélation directe ne peut être établie entre cette augmentation et celle de la concentration de  $\text{Cd}^{2+}$ , ce qui suggère que le  $\text{Cd}^{2+}$  n'est pas la seule forme chimique impliquée dans l'accumulation de Cd. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que les chlorocomplexes ( $\text{CdCl}_n^{2-n}$ ) peuvent être considérés comme étant aussi transportés dans les ostéoblastes MG-63, tel qu'observé dans la lignée entérocytaire TC7 (Jumarie et al., 2001) et suggéré pour les cellules HIEC de la crypte intestinale (Bergeron et Jumarie, 2006). Il est aussi possible que des systèmes de transport à très haute affinité pour le  $\text{Cd}^{2+}$  soit saturé aux concentrations de  $^{109}\text{Cd}$  utilisées, ce qui expliquerait l'absence de corrélation entre l'augmentation de la concentration de  $\text{Cd}^{2+}$  et l'accumulation cellulaire.

### 5.1.3- Mimétisme ionique et systèmes de transport membranaire

Pour s'accumuler à l'intérieur de la cellule, le Cd doit traverser la membrane cellulaire, ce qui représente la première étape critique vers le processus de toxicité. Puisque le Cd ne possède aucun rôle physiologique connu, il est permis de croire qu'il emprunte des voies d'entrée destinées aux éléments essentiels. Bien que le  $\text{Cd}^{2+}$  ne semble pas être la seule forme transportée, sa participation à l'accumulation totale demeure importante. Nos résultats démontrent qu'une portion significative (~ 33%) de l'accumulation cellulaire est inhibée par la présence de Ca en milieu chlorure et nitrate (figure 4.7). Le fait que cette proportion accumulée et sensible au Ca soit similaire dans les deux milieux semble indiquer que le système de transport emprunté par l'ion libre serait déjà saturé en milieu chlorure par une concentration de  $\text{Cd}^{2+}$  de 0.07  $\mu\text{M}$  (14% de 0.5  $\mu\text{M}$ ). Ainsi, lorsque la concentration de l'ion libre passe à 0.4  $\mu\text{M}$  (80% de 0.5  $\mu\text{M}$ ) en milieu nitrate, aucune augmentation du pourcentage d'inhibition ne pourrait être observée. Cette saturation possible du système de transport pourrait s'expliquer par une affinité très élevée du  $\text{Cd}^{2+}$  (très faible valeur de  $K_m$ ) alors que l'affinité des chloro-complexes pour un autre système de transport serait plus faible. Il apparaît clair qu'une partie de l'entrée de Cd dans les cellules MG-63 est inhibée par le Ca et donc que le transport de  $\text{Cd}^{2+}$  peut impliquer des canaux calciques, ceux-ci étant sélectif pour les cations divalents. Les études de Foulkes (1985), conduites sur des jéjunums de rat, ont démontré une inhibition de l'accumulation de Cd par le Ca. Bergeron et Jumarie (2006) observent également une diminution de 30% de l'accumulation de Cd dans les cellules HIEC en présence de Ca en milieu nitrate. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse à ce moment du projet que le  $\text{Cd}^{2+}$  entre par les canaux calciques de type voltage-dépendants (VDCC) dans les ostéoblastes MG-63, hypothèse inspirée d'études menées sur d'autres modèles cellulaires (Hinkle *et al.*, 1987; Friedman et Gesek, 1994; Souza *et al.*, 1996; Baker *et al.*, 2003; Fotakis et Timbrell, 2006b).

Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé une concentration de K de près de 17 fois plus élevée que celle du milieu contrôle (100 mM versus 5,9 mM) afin de



dépolariser la membrane cellulaire et ainsi favoriser l'ouverture des VDCC. Dans ce même but, Leslie et ses collègues (2002) ont utilisé, dans le milieu d'exposition au Cd, une concentration de K dix fois supérieure à celle du milieu contrôle (54 mM versus 5,4 mM). Une concentration élevée en K dans le milieu extracellulaire est fréquemment utilisée afin d'activer les VDCC, ce qui augmente l'influx de Ca dans les cellules (Jagannathan *et al.*, 2002). Notons également qu'en condition de dépolarisation membranaire, l'accumulation non spécifique ne change pas; seule la portion spécifique du transport peut changer suite à l'activation de ces canaux membranaires. Conséquemment, seul le transport spécifique (et sa contribution au transport total) devrait augmenter en conditions de dépolarisation. Cependant, aucune différence significative dans l'accumulation cellulaire de Cd n'a été observée (figure 4.8). Les VDCC ne semblent donc pas être impliqués dans l'entrée de  $\text{Cd}^{2+}$  dans les ostéoblastes MG-63, ce qui est également démontré par l'absence d'effet de la nifédipine et du vérapamil (deux antagonistes de VDCC) sur les niveaux d'accumulation cellulaire mesurés à 3 min (figure 4.9), en milieu nitrate (favorisant la forme  $\text{Cd}^{2+}$ ), en absence de Ca (afin d'éliminer la compétition) et en condition dépolarisante.

Considérant la cytotoxicité du Cd observée dans les cellules MG-63 après 24 heures, nous avons vérifié si les VDCC étaient impliqués sur une plus longue période d'exposition. Des concentrations croissantes de nifédipine et de vérapamil n'ont pas affecté la cytotoxicité du Cd sur les cellules MG-63 (figures 4.11a et 4.12a). De même, le Bay-K8644, un agoniste des VDCC, n'a pas influencé la cytotoxicité du Cd (figure 4.13a). Ces résultats sont en accord avec nos travaux de transport qui indiquent que les VDCC ne sont pas une voie d'entrée pour le Cd dans les cellules MG-63. Pourtant, Hinkle et Osborne (1993) ont pu observer une diminution de moitié de la  $\text{CL}_{50}$  du Cd (6 *versus* 12  $\mu\text{M}$ ) en présence de Bay-K8644 dans la lignée de phéochromocytomes de rat. Bien qu'une incubation de 15 min en excès de K soit connue pour dépolariser la membrane dans de très nombreux types cellulaires, nous n'avons pas directement mesuré ceci dans nos travaux. Il aurait été pertinent de

réaliser des mesures d'accumulation de  $^{45}\text{Ca}$  en présence de concentrations élevées en K avec et sans nifédipine ou vérapamil afin de nous assurer de l'ouverture des VDCC et de leur sensibilité aux bloqueurs dans les cellules MG-63. De plus, le rôle des VDCC devrait aussi être évalué en mesurant l'activité MTT en présence de concentrations de K suffisantes pour dépolariser la membrane, avec ou sans bloqueurs ou activateurs. Nous savons néanmoins que les cellules MG-63 expriment les VDCC puisque Barry (2000) et notre équipe (Labelle *et al.*, données non publiées) avons démontré la présence d'ARNm de VDCC de type L. Nous avons également démontré la présence de VDCC de type L fonctionnels par l'utilisation de Bay-K8644 lors de mesures Ca intracellulaire par fluorescence.

Après avoir obtenu nos résultats n'appuyant pas l'idée d'une implication des canaux VDCC, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le Cd emprunterait les canaux calciques de type TRPC puisque ceux-ci sont activés indépendamment d'une dépolarisation et qu'ils jouent un rôle primordial dans l'homéostasie du Ca dans différents types cellulaires (voir revue Freichel *et al.*, 2005). Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé la thapsigargine qui permet l'ouverture des TRPC, seule ou en combinaison avec le SKF96365, un bloqueur de TRPC. Notons que la thapsigargine est un inhibiteur de la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase du RE, vidant ainsi les stocks intracellulaires de Ca ce qui a pour effet d'activer les TRPC. Nos mesures d'accumulation n'indiquent aucune implication significative des TRPC dans l'entrée de Cd pour la lignée MG-63 (figure 4.10). En effet, la thapsigargine employée seule n'a aucun effet sur le transport de Cd, ce qui peut être expliqué de deux façons : les canaux SOC ne constituent pas une voie d'entrée pour le Cd ou les canaux SOC sont déjà actifs en absence de thapsigargine. Cependant, le fait que l'ajout de SKF96365 ne modifie pas le transport indique que les canaux SOC ne sont pas actifs en absence de thapsigargine. Pourtant, dans notre laboratoire, des mesures de calcium intracellulaire à l'aide de sondes fluorescentes ont indiqué que dans la lignée MG-63, la thapsigargine favorise l'activation SOC et que cette activation est bloquée par l'utilisation de 10  $\mu\text{M}$  SKF96365 (Labelle *et al.*, données non publiées). Ainsi, une

réponse de type SOC classique est observée pour le transport de Ca dans les cellules MG-63. Nos résultats obtenus à l'aide de l'essai MTT indiquent que le SKF96365 n'affecte en rien la cytotoxicité du Cd (figure 4.14a). Cependant, selon nos résultats, 10  $\mu$ M de SKF96365 réduit l'activité MTT (figure 4.14b). Ces derniers résultats concordent avec ceux précédemment obtenus dans notre laboratoire et qui montraient que la présence de SKF96365 dans le milieu d'incubation fait diminuer la viabilité des MG-63 (Labelle *et al.*, données non publiées). En effet, ces travaux montrent que le SKF96365 bloque les canaux SOC activés par l'ajout de PDGF ou de 10% FBS. L'activation SOC, et l'influx Ca, seraient donc importants pour la viabilité des cellules MG-63. De plus, en absence de FBS ou de PDGF, la viabilité est nettement plus faible de même que l'effet inhibiteur du SKF96365 sur cette viabilité résiduelle.

Les mesures MTT obtenues avec le 2APB, nous indiquent qu'il protège les cellules de façon significative contre la toxicité du Cd lorsqu'il est utilisé en concentration suffisamment élevée (50 $\mu$ M et 100 $\mu$ M; figure 4.15a). La diminution (concentration-dépendante) de l'activité MTT en présence de 2APB seul (figure 4.15b) est en accord avec les résultats obtenus dans notre laboratoire qui indiquent que le 2APB diminue la viabilité des MG-63, tel qu'observé avec le SKF96365 (Labelle *et al.*, données non publiées). Nous avons utilisé le 2APB en tant que bloqueur de SOC. Le 2APB a été décrit à l'origine comme un inhibiteur, perméable à la membrane plasmique, de la liaison d'IP<sub>3</sub> à son récepteur (Maruyama *et al.*, 1997). Il faut rappeler que l'activation des TRPC implique une interaction entre IP<sub>3</sub> et ses récepteurs (Kiselyov *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 2000). D'autres études ont démontré que l'effet du 2APB sur cette liaison est faible et que le 2APB est plutôt un inhibiteur direct des canaux SOC dans différents types cellulaires (Dyachok et Gylfe, 2001; Bootman *et al.*, 2002; Thore *et al.*, 2005). Le 2APB est aussi connu comme activateur de TRPV (Hu *et al.*, 2004) et de TRPM6 et comme bloqueur de TRPM7 (Li *et al.*, 2006). Puisque le SKF96365 n'a pas d'effet sur la cytotoxicité du Cd, l'effet protecteur du 2APB ne peut être attribué à son rôle de bloqueur SOC. Ainsi, il semble que l'effet protecteur du 2APB serait plutôt lié à sa capacité à bloquer les

TRPM7. Il serait approprié d'employer le 2APB à 50  $\mu$ M en parallèle avec un activateur de TRPM7 afin de tester une implication possible de ces canaux dans le transport de Cd dans les cellules MG-63 et d'évaluer si le rôle protecteur du 2APB est lié au blocage de ces canaux.

Finalement, les TRPM8, des canaux perméables au  $\text{Ca}^{2+}$  et activés en réponse à une baisse de température, pourraient être de bons candidats pour le transport de Cd dans les ostéoblastes MG-63. Les mesures de MTT effectuées en présence d'icilin, un ouvreur de canaux TRPM8, ne démontrent aucune variation de la sensibilité des cellules au Cd (figure 4.17a). Néanmoins, la capsazépine, un bloqueur de ces mêmes canaux, semble protéger les cellules en faisant diminuer le pouvoir cytotoxique maximal du Cd. Nous croyons possible que les TRPM8 soient déjà actifs en absence d'icilin, ce qui expliquerait qu'aucune variation dans la cytotoxicité ne soit observée en sa présence. Également, nos résultats indiquent que la capsazépine fait diminuer la viabilité cellulaire de manière concentration dépendante (figure 4.16b) en accord avec les résultats obtenus dans notre laboratoire qui montrent que la capsazépine inhibe la viabilité cellulaire tel qu'observé pour le SKF96365 et le 2APB (Labelle *et al.*, données non publiées).



## 5.2- CONCLUSION

Le Cd est un métal lourd toxique dont les effets néfastes sur la santé ont été amplement étudiés au niveau de nombreux organes. Cependant, cette toxicité semble toucher le système osseux d'une façon beaucoup plus subtile que ce qu'on croyait jusqu'à tout récemment. En effet, après ingestion ou inhalation, le Cd peut directement gagner la matrice osseuse pour y causer des dommages qui apparaissent à long terme principalement sous forme d'ostéoporose. Notre projet de recherche fait donc partie d'une démarche globale préventive afin de comprendre et d'identifier les mécanismes impliqués dans le transport et la toxicité du Cd dans les cellules osseuses.

L'utilisation des lignées ostéoblastiques humaines MG-63, SaOS-2 et U2OS nous a permis de démontrer une différence dans la cytotoxicité du Cd ( $CL_{50}$  variant jusqu'à 3 fois). En effet, la lignée MG-63 s'est révélée être plus sensible à la toxicité du Cd que les deux autres. Les résultats d'accumulation cellulaire de Cd nous ont indiqué que la sensibilité différente de ces trois lignées n'est pas attribuable à la quantité de Cd qui s'accumule dans la cellule. Elle pourrait cependant être attribuable à la présence plus ou moins marquée de mécanismes de protection éventuels tels que la prise en charge du Cd par les MTs et la présence de HSP70. Nos essais préliminaires ont indiqué que chacune des lignées expriment les ARNm de MTs et de HSP70 bien qu'aucune induction de MTs dans les trois lignées ostéoblastiques n'ait été observée. D'autres essais seront nécessaires afin de confirmer ces résultats.

De plus, nos résultats ont montré que la spéciation du Cd est déterminante pour son entrée dans les ostéoblastes MG-63. Nous avons également été en mesure de constater la présence de transport spécifique permettant l'entrée de Cd tout en suggérant une accumulation sous forme de  $Cd^{2+}$  et possiblement sous forme de  $CdCl_n^{2-n}$  dans ces cellules. L'observation d'une inhibition de l'entrée de Cd par le Ca nous a mené à étudier les voies calciques. Bien que les VDCC aient été reconnus

comme responsables de l'entrée de Cd dans différents types cellulaires, nos résultats n'indiquent aucune implication de ces canaux dans l'entrée de Cd dans les ostéoblastes MG-63. Notre intérêt a ensuite porté vers la famille des canaux TRP qui comprend plus de 30 canaux cationiques dont la plupart sont perméables au  $\text{Ca}^{2+}$ . Malheureusement, nous n'avons pas pu identifier clairement la ou les voies qui sont empruntées par le Cd, bien que des mesures de MTT obtenues en présence de 2APB et de capsazépine suggèrent la participation respective des canaux TRPM7 et TRPM8. D'autres essais demeurent essentiels pour confirmer ces résultats. De plus, il est nécessaire de continuer à explorer la possibilité que les voies calciques soient responsables d'une partie de l'entrée de Cd dans les ostéoblastes MG-63, tout en envisageant la participation de voies d'entrée autres que les voies calciques.

## CRITIQUE DU PROJET

Se restreindre dans le choix des essais et des techniques employés est une des premières contraintes qu'il m'a été donné de rencontrer en tant qu'étudiante à la maîtrise. On débute un projet d'abord motivé par notre propre volonté d'aller plus loin, de trouver réponse à notre questionnement scientifique, mais aussi stimulé par l'intérêt des chercheurs avec lesquels on fait équipe. Pendant deux années consécutives, tout un apprentissage s'en suit, tant au niveau de la technique que de la réflexion scientifique. Rapidement, les essais que l'on répète, les résultats contradictoires et les petites erreurs de manipulation qui nous retardent nous amènent à restructurer nos objectifs, à les circonscrire à des hypothèses simples. Puis, l'échéance nous pousse à rassembler les résultats obtenus et le travail de rédaction débute. Avec un peu de recule, on réalise que si le projet était à reprendre, on changerait quelques éléments dans sa structure afin de répondre encore plus clairement à nos objectifs premiers.

Ainsi, la plus grande déception suite à la réalisation de ce projet est sans doute notre incapacité à identifier clairement une ou des voies d'entrée empruntées par le Cd dans les ostéoblastes MG-63. Les résultats obtenus nous indiquent quelques pistes à suivre sans toutefois nous fournir de réponse définitive. Bien que cette lacune résulte en grande partie d'un manque de temps, la structure des essais aurait aussi pu être modifiée. À la suite des mesures de transport qui nous ont permis de constater une inhibition de l'accumulation de Cd par le Ca et qui ont donc suggéré l'implication, du moins partielle, de voies calciques dans l'entrée de Cd, il aurait été intéressant d'ajouter à nos objectifs de recherche l'identification des mécanismes du transport de Ca. Pour ce faire, nous aurions pu joindre des analyses de RT-PCR et d'expression protéique des différents canaux à des mesures de transport de <sup>45</sup>Ca. Notons qu'une partie de ces études ont déjà été réalisées dans notre laboratoire et ont servi de prémisses à nos propres travaux. En effet, les canaux TRPM3, 6, 7 et 8 de même que les canaux TRPC1, 3 et 4 ont été identifiés par RT-PCR, les derniers ayant

aussi été détectés par la technique de transfert de type Western (immunobuvardage) dans la lignée MG-63. La littérature nous a également dirigé dans le choix des trois canaux à étudier dans ce projet. Par exemple, les canaux VDCC de type L et T ont été identifiés dans des cellules s'apparentant aux lignées que nous avons utilisées (ostéoblastes de rats, de souris et cellules humaines du mésenchyme en différenciation ostéogénique) et des travaux rapportent également l'expression des canaux de type L, P/Q et N dans les lignées MG-63 et SaOS-2. Après avoir vérifié l'expression de toutes les protéines membranaires visées dans chacune des trois lignées ostéoblastiques, des mesures de transport de  $^{45}\text{Ca}$  et de  $^{109}\text{Cd}$  auraient pu être effectuées parallèlement sur les trois lignées. Ces mesures nous auraient permis de mieux discriminer la contribution des canaux dans l'accumulation totale de Cd en comparant les résultats obtenus dans les lignées exprimant et celles n'exprimant pas ces mêmes canaux. Notons cependant que les résultats obtenus jusqu'à maintenant indiquent que chaque lignée transporte le Cd à un niveau similaire, suggérant le partage des mêmes voies d'entrée entre les trois lignées.

Également, notre deuxième objectif n'a été que partiellement atteint. Bien que les ARNm de MTs et HSP70 aient été identifiés dans les trois lignées cellulaires utilisées, nous n'avons pas été en mesure d'observer une induction par le Cd. Il aurait été intéressant de pouvoir comparer les niveaux d'induction de MTs et de HSP70 dans les trois lignées suite à une exposition au Cd afin d'estimer leur capacité d'adaptation et de développement d'une résistance. Ainsi, la combinaison d'analyse de RT-PCR et en transfert de type Western nous aurait permis de préciser si l'induction d'ARNm mène à l'expression de protéine mature.

Finalement, nous aurions pu ajouter des mesures de MTT pour lesquelles la concentration en Ca du milieu aurait été réduite au minimum afin de vérifier si la cytotoxicité du Cd aurait été augmentée. De plus, des mesures de transport de  $^{45}\text{Ca}$  en conditions dépolarisantes nous auraient permis de vérifier directement la présence de canaux calciques voltage-dépendants fonctionnels. De même, des mesures de  $^{45}\text{Ca}$



devraient être faites en conditions d'activation des canaux TRPC (thapsigargine avec ou sans SKF96365).

Nos résultats ont néanmoins permis d'établir les bases d'utilisation des modèles cellulaires afin de poursuivre efficacement le projet de recherche. À notre connaissance, nous sommes les premiers à étudier le transport de Cd dans les ostéoblastes ainsi que les mécanismes de protection en utilisant trois lignées humaines (MG-63, SaOS-2 et U2OS) aux caractéristiques différentes. Mieux comprendre la réponse cellulaire à une exposition au Cd en fonction de ces caractéristiques propres représente un futur objectif de recherche prioritaire.

## BIBLIOGRAPHIE

ABSHIRE, M.K., BUZARD, G.S., SHIRAISHI, N. et WAALKES, M.P., 1996. Induction of *c-myc* and *c-jun* proto-oncogene expression in rat L6 myoblasts by cadmium is inhibited by zinc preinduction of the metallothionein gene. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **48** (4): 359–377.

AHLIJANIAN, M.K., WESTENBROEK, R.E et CATTERALL, W.A. 1990. Subunit structure and localization of dihydropyridinesensitive calcium channels in mammalian brain, spinal cord, and retina. *Neuron* **46**:819–832.

AMIARD, J.C. et COSSON, R.P. 1997. Les métallothionéines. *Dans* LAGADIC, L., LAQUET, T.H., AMIARD, J.C. et RAMADE, F. (eds), *Biomarqueurs en écotoxicologie : Aspects fondamentaux*, Masson, Paris.

ANDREWS, G.K., HARDING, M.A., CALVET, J.P. et ADAMSON, E.D., 1987. The heat shock response in HeLa cells is accompanied by elevated expression of the *c-fos* proto-oncogene. *Molecular and Cellular Biology* **7** (10): 3452–3458.

AUBIN, J.E. ET LIU, F. 1996. The osteoblast lineage. *Dans*: Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., Rodan, G.A. eds. *Academic Press*, NewYork.

BAKER, T.K., VANVOOREN, H.B., SMITH, W.C. et CARFAGNA, M.A. 2003. Involvement of calcium channels in the sexual dimorphism of cadmium- induced hepatotoxicity. *Toxicology Letters* **137**: 185-192.

BAKKER, A.D., SOEJIMA, K., KLEIN-NULEND, J. et BURGER, E.H. 2001. The production of nitric oxide and prostaglandin E(2) by primary bone cells is shear stress dependent. *Journal of biomechanics*: **34**(5):671–677.

BALDI, C., VAZQUEZ, G., CALVO, J. C., et BOLAND, R. 2003. TRPC3-like protein is involved in the capacitative cation entry induced by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-vitamin D3 in ROS 17/2.8 osteoblastic cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **90**: 197-205.

BANNON, D.J., ABOUNADER, R., LEES, P.S. et BRESSLER, J.P. 2003. Effect of DMT1 knockdown on iron, cadmium, and lead uptake in Caco-2 cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **284**(1): 44-50.

BARON, R. 1993. Anatomy and ultrastructure of bone. *Dans Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Eds Favus, M.J. Second edition, Raven Press, New York.

BARRY, E.L. 2000. Expression of mRNAs for the alpha 1 subunit of voltage-gated calcium channels in human osteoblast-like cell lines and in normal human osteoblasts. *Calcified Tissue International* **66** (22):145-50.

BEATTIE, J.H, OWEN, H.L., WALLACE, S.M., ARTHUR, J.S., KWUN, I.S., HAWKSWORTH, G.M. ET WALLACE, H.M. 2005. Metallothionein overexpression and resistance to toxic stress. *Toxicology Letters* **157**: 69-78.

BELLIDO, T., HUENING, M., RAVAL-PANDYA, M., MANOLAGAS, S.C. et CHRISTAKOS, S. 2000. Calbindin-D<sub>28k</sub> is expressed in osteoblastic cells and suppresses their apoptosis by inhibiting caspase-3 activity. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275, **34** : 26328-26332.

BERGLUND, M., AKESSON, A., BJELLERUP, P. et VAHTER, M. 2000. Metal-Bone interactions. *Toxicology Letters* **112-113**: 219-225.

BERGERON, P.-M. et JUMARIE, C. 2006. Characterization of cadmium uptake in human intestinal crypt cells HIEC in relation to inorganic metal speciation. *Toxicology* **219**: 156-166.

BERRIDGE, M. J., LIPP, P., et BOOTMAN, M. D. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **1**: 11-21

BERTIN, G. et AVERBECK, D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review) *Biochimie* **88**:1549-1559.

BEYERSMANN, D. et HECHTENBERG, S. 1997. Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **144** : 247-261.

BOOTMAN, M. D., COLLINS, T. J., MACKENZIE, L., RODERICK, H. L., BERRIDGE, M. J. et PEPPIATT, C. M. 2002. 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry but an inconsistent inhibitor of InsP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release. *The FASEB Journal: Official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **16**, 1145-1150.

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.

BUCHET, J., LAUWERYS, R., ROELS, H., BERNARD, A., BRUAUX, P., CLAEYS, F., DUCOFFRE, G., DE PLAEN, P., STAESSEN, J., AMERY, A., LIJNEN, P., THIJS, L., RONDIA, D., SARTOR, F., SAINT REMY, A. et NICK, L. 1990. Renal effects of cadmium body burden of the general population. *Lancet* **336**: 699-702.

CATTERALL, W.A. 1995. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annual Review of Biochemistry* **64**:493-531.

CATTERALL, W.A. 2000. Structure and Regulation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  Channels. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **16**: 521-555.

CECCHINI, M.G., HOFSTETTER, W., HALASY, J., WETTERWALD, A. et FELIX, R. 1997. Role of CSF-1 in bone and bone marrow development. *Molecular and reproductive development* **46**: 75-84. *Revue*.

CHELLAPPAN, S. P., HIEBERT, S., MUDRYJ, M., HOROWITZ, J.M. et NEVINS J. R. 1991. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* **65**:1053-1061.

CONOVER, C.A. 1996. The role of insulin-like growth factors and binding proteins in bone cells biology. *Dans: Principles of Bone Biology*. Bilezikian, J.P., Raisz, L.G. et Rodan, G.A., eds. Academic Press, San Diego, CA.

COYLE, P., NIEZING, G., SHELTON, T.L., PHILCOX, J.C. et ROFE, A.M. 2000. Tolerance to cadmium hepatotoxicity by metallothionein and zinc: in vivo and in vitro studies with MT-null mice. *Toxicology* **150**: 53-67.

COYLE, P., PHILCOX, J.C., CAREY, L.C. et ROFE, A.M. 2002. Metallothionein: The multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**:627-647.

CRAGG, R.A., CHRISTIE, G.R., PHILLIPS, S.R., RUSSI, R.M., KURY, S., MATHERS, J.C., TAYLOR, P.M. et FORD, D. 2001. A novel zinc regulated human zinc transporter, hZTL1, is localized to the enterocytes apical membrane. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 22789-22797.



CURTIN, J.F., DONOVAN, M. et COTTER, T.G. 2002. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *Journal of Immunological Methods* **265**: 49-72.

DE BLASIO, A., MESSINA, C., SANTULLI, A., MANGANO, V., DI LEONARDO, E., D'ANNEO, A., TESORIERE, G. et VENTO, R. 2005. Differentiative pathway activated by 3-aminobenzamide, an inhibitor of PARP, in human osteosarcoma MG-63 cells. *Federation of European Biochemical Society Letters* **579** (3):615-20.

DEHN, P.F., WHITE, C.M., CONNERS, D.E., SHIPKEY, G. et CUMBO, T.A. 2004. Characterization of the human hepatocellular carcinoma (hepg2) cell line as an in vitro model for cadmium toxicity studies. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal* **40**: 172-82.

DELRASO, N.J., FOY, B.D., GEARHART, J.M., et FRAZIER, J.M. 2003. Cadmium uptake kinetics in rat hepatocytes: correction for albumin binding. *Toxicological Sciences* **72**(1):19-30.

DOHI, Y., SUGIMOTO, K., YOSHIKAWA, T., OHGUSHI, H., KATSUDA, T., TABATA, S. et MORIYAMA, T. 1993. Effect of cadmium on osteogenesis within diffusion chambers by bone marrow cells: biochemical evidence of decreased bone formation capacity. *Toxicology and Applied Pharmacology* **120**: 274-280.

DYACHOK, O. et GYLFE, E. 2001. Store-operated influx of  $\text{Ca}^{2+}$  in pancreatic beta-cells exhibits graded dependence on the filling of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science* **114**: 2179-2186.

EATON, D.L. et KLAASSEN, C.D. 1996. Principles of Toxicology. *Dans Casarett and Doull's toxicology, the basic sciences of poisons*, fifth Edition. Éditeur: C.D. Klaassen. McGraw-Hill, Montréal.

ELISMA, F. et JUMARIE, C. 2001. Evidence for cadmium uptake through NRAMP2: Metal speciation studies with Caco-2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **285**: 662-668.

FAN, L.Z. et CHERIAN, M.G.. 2002. Potential role of p53 on metallothionein induction in human epithelial breast cancer cells, *Br. J. Cancer* **87** :1019-1926.

FARZANEH, P., ALLAMEH, A., PRATT, S., MOORE, N., TRAVIS, L., GOTTSCHALG, E., KIND, C. et FRY, J. 2005. Increased heat shock protein 70 expression following toxicant-mediated cytotoxicity: a ubiquitous marker of toxicant exposure? *Alternative to Laboratory Animal* **33**: 105-10.

- FERNANDES, R.S. et COTTER, T.G. 1994. Apoptosis or necrosis: intracellular levels of glutathione influence mode of cell death. *Biochemical Pharmacology* **48**: 675-681.
- FLANAGAN, J.L. et FRIEDMAN, P.A. 1991. Parathyroid hormone-stimulated cadmium accumulation in Madin-Darby canine kidney cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **109**: 241-250.
- FORWOOD, M.R. 1996. Inducible cyclo-oxygenase (COX-2) mediates the induction of bone formation by mechanical loading in vivo. *Journal of bone and mineral research* **11**(11):1688-1693.
- FOTAKIS, G. et TIMBRELL, J.A. 2006a. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters* **160**: 171-177.
- FOTAKIS, G. et TIMBRELL, J.A. 2006b. Role of trace elements in cadmium chloride uptake in hepatoma cell lines. *Toxicology Letters* **164**: 97-103.
- FOULKES, E.C. 1985. Interactions between metals in rat jejunum: implications on the nature of cadmium uptake. *Toxicology* **37**(1-2):117-125.
- FREICHEL, M., VENNEKENS, R., OLAUSSON, J., STOLZ, S., PHILIPP, S.E., WEISSGERBER, P. et FLOCKERZI, V. 2005. Functional role of TRPC proteins in native systems: implications from knockout and knock-down studies. *Journal of Physiology* **567**:59-66.
- FRIEDMAN, P.A. et GESEK, F.A. 1994. Cadmium uptake by kidney distal convoluted tubule cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **128**: 257-263.
- GEORING, P.L., FISHER, B.R., NOREN, B.T., PAPACONSTANTINOU, A., ROJKO J.L. et MARLER R.J. 2000. Mercury induces regional and cell-specific stress protein expression in rat kidney. *Toxicological Sciences* **53**: 447-457.
- GIACINTI, C. et GIORDANO, A. 2006. RB and cell cycle progression. *Oncogene* **25**: 5220-5227.
- GOLSTEIN, R.S. et SCHNELLMANN, R.G. 1996. Toxic responses of the kidney. *Dans Casarett and Doull's toxicology, the basic sciences of poisons, fifth Edition. Éditeur: C.D. Klaassen. McGraw-Hill, Montréal.*
- GORI F., HOFBAUER L.C., DUNSTAN C.R., SPELSBERG T.C., KHOSLA S. et RIGGS B.L. 2000. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the

support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology* **12**: 4768-4776.

GOUVERNEMENT DU CANADA, ENVIRONNEMENT CANADA et SANTÉ CANADA. 1994. Liste des substances d'intérêt prioritaire: Rapport d'évaluation: Le cadmium et ses composés. Ministère des Approvisionnements et Services Canada, Ottawa.

GOYER, A.G. 1996. Toxic effects of metals. *Dans Casarett and Doull's toxicology, the basic sciences of poisons, fifth Edition. Éditeur: C.D. Klaassen. McGraw-Hill, Montréal.*

GOYER, A.G. et CLARKSON, T.W. 2001. Toxics effects of metals. *Dans Casarett and Doull's toxicology, the basic sciences of poisons, fifth Edition. Éditeur: C.D. Klaassen. McGraw-Hill, Montréal.*

GREGUS, Z. et KLAASSEN, C.D. 1996. Mechanisms of toxicity. *Dans Casarett and Doull's toxicology, the basic sciences of poisons, fifth Edition. Éditeur: C.D. Klaassen. McGraw-Hill, Montréal.*

GRUENHEID, S., CELLIER, M., VIDAL, S. et GROS, P. 1995. Identification and characterization of a second mouse Nramp gene. *Genomics* **25**: 514-525.

GU, Y., PRESTON, M.R., EL HAJ, A.J., HAMID, J., ZAMPONI, G.W., HOWL, J. et PUBLICOVER, S.J. 1999. Osteoblasts derived from load-bearing bones of the rat express both L- and T-like voltage-operated calcium channels and mRNA for alpha 1C, alpha 1D and alpha 1G subunits. *Pflugers Archives* **438** (4) :553-560.

GUNSHIN, H., MACKENZIE, B., BERGER, U.V., GUNSHIN, Y., ROMERO, M.F., BORON, W.F., NUSSBERGER, S., GOLLAN, J.L. et HEDIGER, M.A. 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* **388**: 482-488.

HAGINO, H., KURAOKA, M., KAMEYAMA, Y., OKANO, T. et TESHIMA, R. 2005. Effect of a selective agonist for prostaglandin E receptor subtype EP4 (ONO-4819) on the cortical bone response to mechanical loading. *Bone* **36**(3):444-453.

HARRIS, C.C. et HOLLSTEIN, M. 1993. Clinical implications of the p53 tumour-suppressor gene. *The New England Journal of Medicine* **329**: 1319-1327.



HATTAR, S., BERDAL, A. ASSELIN, S. et LOTY, D.C. Greenspan and J-M Sautier. 2002. Behaviour of moderately differentiated osteoblast-like cultured in contact with bioactive glasses. *European Cells and Materials* **4** : 61-69.

HATTORI, T., MAHASHI, H., MIYAZAWA, T. et NAITO, M. 2001. Potentiation by stannous chloride of calcium entry into osteoblastic MC3T3-E1 cells through voltage-dependent L-type calcium channels. *Cell Calcium*. **30** :67-72.

HEILMAIER, H.E., DRASCH, G.A., KRETSCHMER, E. et SUMMER, K.H. 1987. Metallothionein, cadmium, copper and zinc levels of human rat and tissues. *Toxicology Letters* **38**: 205-211.

HINKLE, P.M., KINSELLA, P.A. et OSTERHOUDT, K.C. 1987. Cadmium Uptake and Toxicity via Voltage-sensitive Calcium Channels. *The Journal of Biological Chemistry* **262**: 16333-16337.

HINKLE, P.M. et OSBORNE, E.M. 1993. Cadmium toxicity in rat pheochromocytoma cells: studies on the mechanism of uptake. *Toxicology and Applied Pharmacology* **124**: 91-98.

HOENDEROP, J.G., VAN DER KEMP, A.W., URBEN, C.M., STRUGNELL, S.A. et BINDELS, R.J. 2004. Effects of vitamin D compounds on renal and intestinal  $\text{Ca}^{2+}$  transport proteins in 25-hydroxyvitamin D3-1 $\alpha$ -hydroxylase knockout mice. *Kidney International* **66**(3):1286-1287.

HOLMBERG, C. I., HIETAKANGAS, V., MIKHAILOV, A., RANTANEN, J.O., KALLIO, M., MEINANDER, A., HELLMAN, J., MORRICE, N., MACKINTOSH, C., MORIMOTO, R.I., ERIKSSON, J.E., et SISTONEN, I. 2001. Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat-shock factor 1. *European Molecular Biology Organization Journal* **20**:3800-3810.

HORWOOD, N.J., ELLIOTT, J., MARTIN, T.J. et GILLESPIE, M.T. 1998. Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. *Endocrinology* **139**:4743-4746.

HU, H.Z., GU, Q., WANG, C., COLTON, C.K., TANG, J., KINOSHITA-KAWADA, M., LEE, L.Y., WOOD, J.D. et ZHU, M.X. 2004. 2-Aminoethoxydiphenyl borane is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *Journal of Biology and Chemistry* **279**: 35741-35748.

HUANG, J.C., SAKATA, T., PFLEGER, L., BENCSIK, M., HALLORAN, B.P., BIKLE, D.D. et NISSENSON, R.A. 2004. PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. *Journal of bone and mineral research* **19**(2):235-44.



HUSSAIN, R.F., NOURI, A.M.E. et OLIVER, R.T.D. 1993. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *Journal of Immunological Methods* **160**:89-96.

IARC (International Agency for Research on Cancer). 1993. Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. Dans: International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Human, vol.58. IARC Scientific Publications, Lyon.

ICETT. 1998. International Center for Environmental Technology Transfer. Japan Government, <http://www.icett.or.jp>.

JAGANNATHAN, S., PUBLICOVER, S.J. et BARRATT, C.L. 2002. Voltage-operated calcium channels in male germ cells. *Reproduction* **123**: 203-215.

JÄRUP, L., CARLSSON, M.D., ELINDER, C.-G., HELLSTRÖM, L., PERSSON, B. et SCHÜTZ, A. 1995. Enzymuria in a population living near a cadmium battery plant. *Occupational and Environmental Medicine* **52**: 770-772.

JÄRUP, L., BERGLUND, M., ELINDER, C.G., NORDBERG, G. et VAHTER, M. 1998. Health effects of cadmium exposure-a review of the literature and a risk estimate. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health* **24**: 1-52.

JARÜP, L. 2003. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* **68**:167-182.

JUMARIE, C., FORTIN, C., HOUDE, M., CAMPBELL, P.G. et DENIZEAU, F. 2001. Cadmium uptake by Caco-2 cells: effects of Cd complexation by chloride, glutathione, and phytochelatins. *Toxicology and Applied Pharmacology* **170**: 29-38.

JUMARIE, C., CAMPBELL, P.G., BERTELOOT, A., HOUDE, M. et DENIZEAU, F. 1997. Caco-2 cell line used as an in vitro model to study cadmium accumulation in intestinal epithelial cells. *The Journal of membrane biology* **158** (1): 31-48.

KEOGH, J.P., STEFFEN, B. et SIEGERS, C.P. 1994. Cytotoxicity of heavy metals in the human small intestinal epithelial cell line I-407: the role of glutathione. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **43**(3):351-9.

KETERRER, B. 1988. Protective role of glutathion and glutathion transferases in mutagenis and carcinogenis. *Mutation Research* **202**: 343-361.

- KIMURA, T., ITOH, N., MIN, K.S., FUJITA, I., MUTO, N. et TANAKA, K. 1998. Tissue accumulation of cadmium following oral administration to metallothionein-null mice. *Toxicology Letters* **99**: 85-90.
- KISELYOV, K., XU, X., MOZHAYEVA, G., KUO, T., PESSAH, I., MIGNERY, G., ZHU, X., BIRNBAUMER, L. et MUALLEM, S. 1998. Functional interaction between InsP3 receptors and store operated Htrp3 channels. *Nature* **396**:478-482.
- KITAZAWA, R. et KITAZAWA, S. 2001. Vitamin D3 augments osteoclastogenesis via vitamin D-responsive element of mouse RANKL gene promoter. *Biochemical and biophysical research communications* **290**:650-655.
- KLASSEN, C.D. et LIU, J. 1998. Metallothionein transgenic and knock-out mouse models in the study of cadmium toxicity. *Journal of toxicological Sciences Suppl.* **2**: 97-102.
- KLAASSEN, C.D., LIU, J. et CHOUDHURI, S. 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **39**:267-294.
- KONO, Y., ISHIKAWA, T. et KONDO, M. 1981. Purification and properties of cadmium binding protein in bone. *Eisei Kagaku* **27**: 212-217.
- KRISHNAMURTI, G.S.R. et NAIDU, R., 2000. Speciation and phytoavailability of cadmium in selected surface soils of South Australia. *Australian Journal of Soil Research* **38**: 991-1004.
- KUWAHARA, M., OTA, T., GU, Y., ASAI, T., TERADA, Y., AKIBA, T. et MARUMO, F. 2002. Renal expression of metallothionein in rats treated with cadmium. *Clinical and Experimental Nephrology* **6**:79-84.
- LACEY, D.L., TIMMS, E., TAN, H.L., KELLEY, M.J., DUNSTAN, C.R., BURGESS, T., ELLIOT, R., COLOMERO, A., ELLIOT, G., SCULLY, S., HSU, H., SULLIVAN, J., HAWKINS, N., DAVY, E., CAPPARELLI, C., ELI, A., QIAN, Y.X., KAUFMAN, S., SAROSI, I., SHALHOUB, V., SENALDI, G., GUO, J., DELANEY, J. et BOYLE, W.J. 1998. Osteoprotegerin (OPG) ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**:165-176.
- LAJEUNESSE, D., FRONDOZA, C., SCHOFFIELD, B. et SACKTOR, B. 1990. Osteocalcin secretion by the human osteosarcoma cell line MG-63. *Journal of Bone and Mineral Research* **5**(9):915-22.

- LAJEUNESSE, D., KIEBZAK, G.M., FRONDOZA, C. et SACKTOR, B. 1991. Regulation of osteocalcin secretion by human primary bone cells and by the human osteosarcoma cell line MG-63. *Bone and Mineral* **14**(3):237-50.
- LANSMAN, J.B., HESS, P. et TSIEN, R.W. 1986. Blockade of current through single calcium channels by  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , and  $\text{Ca}^{2+}$ . *Journal of General Physiology* **88**:321-347.
- LESLIE, E.M., LIU, J., KLAASSEN, C.D. et WAALKES, M.P. 2002. Acquired Cadmium Resistance in Metallothionein-I/II(-/-) Knockout Cells: Role of the T-Type Calcium Channel  $\text{Ca}_v1.3$  in Cadmium Uptake. *Molecular Pharmacology* **69**:629-639.
- LEVINE, A.J., MOMAND, J. et FINLAY, C.A. 1991. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* **351**: 453-456.
- LI, S., CHIEN, S. et BRANEMARK, P.I. 1999. Heat-shock-induced necrosis and apoptosis in osteoblasts. *Journal of Orthopaedic Research* **17**(6): 891-899.
- LI, M., JIANG, J. et YUE, L. 2006. Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7. *Journal of General Physiology* **127**(5):525-37
- LIU, Y., LIU, J., ISZARD, M.B., ANDREWS, G.K., PALMITER, R.D. et KLAASSEN, C.D. 1995. Transgenic mice that overexpress metallothionein-I are protected from cadmium lethality and hepatotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* **135**: 222-228.
- LOGOTHETIS, C.J. et LIN, S.-H. 2005. Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nature Reviews Cancer* **5**: 21-28.
- LOVELAND, B.E., JOHNS, T.G., MACKAY, I.R., VAILLANT, F., WANG, Z.-X. et HERTZOG, P.J. 1992. Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative assays. *Biochemistry International* **27**:501-510.
- MA, H.-T., PATTERSON, R.L., VAN ROSSUM, D.B., BIRNBAUMER, L., MIKOSHIBA, K. et GILL, D.L. 2000. Requirement of the Inositol Trisphosphate Receptor for Activation of Store-Operated  $\text{Ca}^{2+}$  Channels. *Science* **287**: 1647-1651.
- MA, Y.L., CAIN, R.L., HALLADAY, D.L., YANG, X., ZENG, Q., MILES, R.R., CHANDRASEKHAR, S., MARTIN, T.J. et ONYIA, J.E. 2001. Catabolic effects of continuous human PTH (1-38) in vivo is associated with sustained stimulation of



RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology* **142**:4047–4054.

MACHO, A., HIRSCH, T., MARZO, I., MARCHETTI, P., DALLAPORTA, B., SUSIN, S. A., ZAMZAMI, N., et KROEMER, G. 1997. Glutathione depletion is an early and calcium elevation is a late event of thymocyte apoptosis. *Journal of Immunology* **158** : 4612–4619.

MARGOSHES, M. et VALLEE, B.L. 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex, *Journal of the American Chemical Society* **79**: 4813–4814.

MARIE, P.J. 1999. Osteoblasts and bone formation. *Dans* : Zaidi, M. ed. *Advances in organ biology : molecular and cellular biology of bone*. JAI Press, Stamford, CT (USA).

MARIE, P. 2001. Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *Medecine Sciences* **17**: 1252–1259.

MARUYAMA, T., KANAJI, T., NAKADE, S., KANNO, T. et MIKOSHIBA, K. 1997. 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release. *Journal of Biochemistry* **122**: 498–505.

MASTERS, B.A., KELLY, E.J., QUAIFE, C.J., BRINSTER, R.L. et PALMITER, R.D. 1994. Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 584–588.

MCCONKEY, D. J. et ORRENIUS, S. 1996. The role of calcium in the regulation of apoptosis *Journal of Leukocyte Biology* **59** : 775–783.

MICHALSKA, A.E. et CHOO, K.H. 1993. Targeting and germ-line transmission of a null mutation at the metallothionein I and II loci in mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 8088–8092.

MIYAHARA, T., TAKATA, M., MORI-UCHI, S., MIYATA, M., NAGAI, M., SUGURE, A., MATSUSISTA, M., KOZUKA, H. et KUZE, S. 1992. Stimulative effects of cadmium on bone resorption in neonatal parietal bone resorption. *Toxicology* **73**:93–9.

MIYAMOTO, T. et SUDA, T. 2002. Differentiation and function of osteoclasts. *Keio Journal of Medecine* **52**: 1–7.



MONTELL, C., BIRNBAUMER, L., FLOCKERZI, V. 2002. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* **108** :595-598.

MONTEILH-ZOLLER, K., HERMOSURA, M.C., NADLER, M.J., SCHARENBERG, A.M., PENNER, R. et FLEIG, A. 2003. TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions, *Journal of General Physiology* **121** :49-60.

MORAN, M.M., XU, H. et CLAPHAN, D.E. 2004. TRP ion channels in the nervous system, *Current Opinion in Neurobiology* **14** :362-369.

MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**:55-63.

MULLENDER, M., EL HAJ, A.J., YANG, Y., VAN DUIN, M.A., BURGER, E.H. ET KLEINNULEND, J. 2004. Mechanotransduction of bone cells in vitro: mechanobiology of bone tissue. *Medical and Biological Engineering and Computing* **42**(1):14-21.

MURRAY, E., PROVVEDINI, D., CURRAN, D., CATHERWOOD, B., SUSSMAN, H., et MANOLAGAS, S. 1987. Characterization of human osteoblastic osteosarcoma cell line (SaOS-2) with high bone alkaline phosphatase activity. *Journal of Bone and Mineral Research* **2** :231-238.

NING, J. et GRANT, M.H. 2000. The role of reduced glutathione and glutathione reductase in the cytotoxicity of chromium (VI) in osteoblasts. *Toxicology In Vitro* **14** : 329-335.

NOGAWA, K., TSURITANI, I., KIDO, T., HONDA, R., YAMADA, Y. et ISHIZAKI, M. 1987. Mechanism for bone disease found in inhabitants environmentally exposed to cadmium: decreased serum 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D level. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, **59**: 21-30.

ODA, N., SOGAWA, C.A. SOGAWA, N., ONODERA, K., FURUTA, H. et YAMAMOTO, T. 2001. Metallothionein expression and localization in rat bone tissue after cadmium injection. *Toxicology Letters* **123**: 143-150.

OHTA, H., YAMAUCHI, Y., NAKAKITA, M., TANAKA, H., ASAMI, B. S., SEKI, Y. et YOSHIKAWA, H. 2000. Relationship between renal dysfunction and bone metabolism disorder in male rats after long-term oral quantitative cadmium administration. *Industrial Health*, **38**(4): 339-355.

OKUBO, M., YAMADA, K., HOSOYAMADA, M., SHIBASAKI, T et ENDOU, H. 2003. Cadmium transport by human Nramp 2 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* **187**(3):162-167.

OLABARRIETAA, I., L'AZOUB, B., YURICB, S., CAMBARB, J. et CAJARAVILLEA, M.P. 2001. In vitro effects of cadmium on two different animal cell models. *Toxicology in Vitro* **15**: 511-517.

PALMITER, R.D. et FINDLEY, S.D. 1995. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *European Molecular Biology Organization Journal* **14**: 639-649.

PEDERSEN, S.T., OWSIANIK, G. et NILIUS, B. 2005. TRP channels: An overview. *Cell Calcium* **38**: 233-252.

PELHAM, H. R. 1982. A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp70 heat-shock gene. *Cell* **30**:517-528.

PHAM, T.N., SEGUI, J.A., FORTIN, C., CAMPBELL, P.G., DENIZEAU, F. et JUMARIE, C. 2004. Cadmium uptake in rat hepatocytes in relation to speciation and to complexation with metallothionein and albumin. *Journal of Cellular Physiology* **201**(2):320-330.

QU, W., LUI, J. FUGUAY, R. SHIMODA, R., SAKURAI, T., SAAVEDRA, J.E., KEEFER, L.K. et WAALKES, M.P. 2005. The nitric oxide prodrug, V-PYRRO/NO, protects against cadmium toxicity and apoptosis at the cellular level. *Nitric Oxide* **12**:114-20.

RAMSEY, I.S., DELLING, M. et CLAPHAM, D.E. 2006. An introduction to TRP channels. *Annual Review of Physiology* **68**: 619-647.

RYU, D.Y., LEE, S.J., PARK, D.W., CHOI, B.S., KLAASSEN, C.D. et PARK, J.D. 2004. Dietary iron regulates intestinal cadmium absorption through iron transporters in rats. *Toxicology Letters* **152**(1):19-25.

SARIMOV, R., MARKOVA, E., JOHANSSON, F., JENSSEN, D. et BELYAEV, I. 2005. Exposure to ELF magnetic field tuned to Zn inhibits growth of cancer cells. *Bioelectromagnetics* **29**.

SATARUG, S., BAKER, J.R., URBENJAPOL, S., HASWELL-ELKINS, M., REILLY, P.E.B., WILLIAMS, D.J. et MOORE, R. 2003. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicology Letters* **137**: 65-83.

- SATARUG, S. et MOORE, M. R. 2004. Adverse Health Effects of Chronic Exposure to Low-Level Cadmium in Foodstuffs and Cigarette Smoke. *Environmental Health Perspectives* **112**:1099-1103.
- SAUER, J.M., WAALKES, M.P., HOOSER, S.B., BAINES, A.T., KUESTER, R.K. et SIPES, I.G. 1997. Tolerance induced by all-trans-retinol to the hepatotoxic effects of cadmium in rats: role of metallothionein expression. *Toxicology and Applied Pharmacology* **143**:110-9.
- SHAFFER, J.T. 1998. Effects of Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> and CH<sub>3</sub>Hg on high voltage activated calcium currents in pheochromocytoma (PC12) cells: potency, reversibility, interactions with extracellular Ca<sup>2+</sup> and mechanisms of block. *Toxicology Letters* **99**: 207-221.
- SILEVIS-SMITT, P.A.E., VAN BEEK, H., BAARS, A.-J., TROOST, D., LOUWERSE, E.S., KROPS-HERMUS, A.C.M., DE WOLF, F.A. et DE JONG, J.M.B. 1992. Increased metallothionein in the liver and kidney of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of Neurology* **49**:721-724.
- SINGH, O.V., LABANA, S., PANDEY, G. et BUDHIRAHIA, R. 2003. Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied microbiology and biotechnology* **61**: 405-412.
- SLOOTWEG, M.C. 1993. Growth hormone and bone. *Hormone and Metabolic Research* **25**:335-43.
- SMIT, E.F., GROEN, H.J.M, SPLINTER, T.A.W., EBELS, T. et POSTMUS, P.E. 1996. Prognostic factors in resectable non-small cell lung cancer. *Thorax* **51**: 638-646.
- SOUZA, V., BUCIO, L., JAY, D., CHAVEZ, E. et GUTIERREZ-RUIZ, C.M. 1996. Effect of cadmium on calcium transport in a human fetal hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology* **112**: 97-104.
- SOUZA, V., ESCOBAR, M.C., GOMEZ-QUIROZ, L., HERNANDEZ, E., COSSIO, E.C. et GUTIERREZ-RUIZ, M.C. 2004. Acute cadmium exposure enhances AP-1 DNA binding and induces cytokines expression and heat shock protein 70 in HepG2 cells. *Toxicology* **197**: 213-28.
- STUART, G.W., SEARLE, P.F., CHEN, H.Y., BRINSTER, R.L. et PALMITER, R.D. 1984. A 12-base-pair DNA motif that is repeated several times in metallothionein gene promoters confers metal regulation to a heterologous gene.



Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **81**: 7318-7322.

TALLKVIST, J., BOWLUS, C.L. et LONNERDAL, B. 2001. DMT1 gene expression and cadmium absorption in human absorptive enterocytes. *Toxicology Letter* **20**; **122(2)**:171-7.

TANAKA, S., TAKAHASHI, N., UDAGAWA, N., TAMURA, T., AKATSU, T., STANLEY, E.R., KUROKAWA, T. et SUDA, T. 1993. Macrophage colonystimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *Journal of clinical investigation* **91**:257-263.

TAYLOR, W.R. 1988. Permeation of barium and cadmium through slowly activating calcium channels in cat sensory neurons. *Journal of Physiology* **407**: 433-452.

TCHOUNWOU, P.B., ISHAQUE, A.B. et SCHNEIDER, J. 2001. Cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma cells (HepG<sub>2</sub>) expose to cadmium chloride. *Molecular and Cellular Biochemistry* **221**: 21-28.

THOMAS, D.M., CARTY, S.A., PISCOPO, D.M., LEE, L.S., WANG, W.F., FORRESTER, W.C., et HINDS, P.W. 2001. The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation. *Molecular Cell* **8(2)** :303-316.

THORE, S., DYACHOK, O., GYLFE, E. et TENGHOLM, A. 2005. Feedback activation of phospholipase C via intracellular mobilization and store-operated influx of Ca<sup>2+</sup> in insulin-secreting beta-cells. *Journal of Cell Science* **118**:4463-4471.

TOPPETS, V., PASTORET, V., DE BEHR, V., ANTOINE, N., DESSY, C. et GABRIELA, A. 2004. Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. *Annales de médecine vétérinaire* **148**:1-13.

TORTORA, G.J. ET GRABOWSKI, S.R. 2001. Principes d'anatomie et de physiologie. Éditions du renouveau pédagogique inc., St-Laurent.

TSIEN, R.W., HESS, P., MCCLESKEY, E.W. et ROSENBERG, R.L. 1987. Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation, and block. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* **16**: 265-290.

TSIEN, R.W. et TSIEN, R.Y. 1990. Calcium channels, stores, and oscillations. *Annual review of cell biology* **6**:715-760. *Revue*.



- URANI, C., MELCHIORETTO, P., CANEVALI, C. et CROSTA, G.F. 2005. Cytotoxicity and induction of protective mechanisms in HepG2 cells exposed to cadmium. *Toxicology In Vitro. Article sous presse.*
- VENNEKENS, R., VOETS, T., BINDELS, R. J., DROOGMANS, G., et NILIUS, B. 2002. Current understanding of mammalian TRP homologues. *Cell Calcium* **31**, 253-264.
- VIG, K., MEGHARAJ, M., SETHUNATHAN, N. et NAIDU, R. 2003. Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review. *Advances in Environmental Research* **8**: 121-135.
- WAALKES, M. P. et WARD, J. M. 1989. Induction of hepatic metallothionein in male B6C3F1 mice exposed to hepatic tumor promoters: effects of phenobarbital, acetaminophen, sodium barbital, and di(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicology and Applied Pharmacology* **100**:217-226.
- WATJEN, W., COX, M., BIAGIOLI, M. et BEYERSMANN, D. 2002. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: mediation by caspase 9-activation. *Biometals* **15**: 15-25.
- WEINBERG, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81** :323-330.
- WILSON, A.K., CERNY, E.A., SMITH, B.D., WAGH, A. et BHATTACHARYYA, M.H. 1996. Effects of Cadmium on Osteoclast Formation and Activity *in Vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology* **140**, 451-460.
- WU, C. 1995. Heat-shock transcription factors: structure and regulation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **11**:441-469.
- WU, M.-T., DEMPLE, B., BENNETT, R.A.O., CHRISTIANI, D.C., FAN, R. et HU, H. 2000. Individual variability in the zinc inducibility of metallothionein-IIA mRNA in human lymphocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **61**:553-567.
- XIE, X.K., YAND, D.S., YE, Z.M. et TAO, H.M. 2005. Construction of antisense c-myc recombinant adenovirus and its anti-tumor effects on osteosarcoma cell lines MG-63 and U2OS. (Article en Chinois) *Ai Zheng* **24** :292-297.
- YOSHIDA, M., OHTA, H., YAMAUCHI, Y., SEKI, Y., SAGI, M., YAMAZAKI, K. et SUMI, Y. 1998. Age-dependent changes in metallothionein levels in liver and kidney of the Japanese. *Biological Trace Element Research* **63**:167-175.

ZAHANICH, I., GRAF, E.M., HEUBACH, J.F., HEMPEL, U., BOXBERGER, S. et RAVENS, U. 2005. Molecular and functional expression of voltage-operated calcium channels during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Bone and Mineral Research* **20** (9) : 1637-1646.

ZALUPS, R.K. et AHMAD, S. 2003. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicology and Applied Pharmacology* **186** : 163-188.

ZELZER, E. et OLSEN, B.R. 2005. Multiple roles of vascular endothelial growth factor (VEGF) in skeletal development, growth, and repair. *Current topics in developmental biology* **65** :169-187.

ZHENG, H., LIU, J., CHOO, K.H.A., MICHALSKA, A.E. et KLAASSEN, C.D., 1996. Metallothionein-I and -II knock-out mice are sensitive to cadmium-induced liver mRNA expression of c-jun and p53. *Toxicology and Applied Pharmacology* **136** : 229-235.